



CATARINA
MENDES
FIGUEIREDO

EFEITO DE VÁRIOS *STRESSES* ABIÓTICOS NOS
METABOLITOS PRESENTES NA FOLHA DE
OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)



**CATARINA
MENDES
FIGUEIREDO**

**EFEITO DE VÁRIOS *STRESSES* ABIÓTICOS NOS
METABOLITOS PRESENTES NA FOLHA DE
OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Celeste Dias, investigadora de pós-doutoramento da Unidade de Investigação de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares da Universidade de Aveiro e do Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra, e do Doutor Artur M. S. Silva, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da FCT e do FSE no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio.

o júri

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Arguente

Prof. Doutora Ana Maria Loureiro da Seca
professora auxiliar do Departamento de Ciência da Química, Física e Engenharia da Universidade dos Açores

Orientador

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva
professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Quero deixar um agradecimento especial a todos aqueles que encorajaram e contribuíram para a realização do presente trabalho.

À minha orientadora, Doutora Celeste Dias, pela orientação, pelo apoio, pelos conhecimentos transmitidos e sobretudo por toda a disponibilidade.

Ao meu orientador, Professor Artur Silva, pela orientação, pela crítica e pela disponibilidade.

À Professora Diana Pinto, por toda a disponibilidade e ensinamento prestados.

Foi uma honra ser vossa aluna.

Aos meus colegas, pela forma como fui recebida e pelo espírito de entreajuda.

E, por fim, á minha família, pela dedicação, esforço, paciência, confiança e encorajamento ao longo de todo este percurso.

A todos vós, um muito sincero obrigado.

palavras-chave

atividade antioxidante, choque térmico, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), metabolitos, radiação UVB, seca

resumo

A oliveira, *Olea europaea* L., é uma árvore de fruto originária da região mediterrânica com elevado valor económico. O azeite tem sido cada vez mais reconhecido pelos seus efeitos benéficos na saúde, contudo, também nas folhas de oliveira são encontrados diversos compostos com atividade biológica como compostos fenólicos, ácidos gordos, terpenos, álcoois, esteróis, hidrocarbonetos, açúcares e minerais. No entanto, a composição das folhas de oliveira não é constante, dependendo de diversos fatores, nomeadamente fatores ambientais. Devido à exposição a diversos *stresses* abióticos, o metabolismo e a fisiologia das folhas de oliveira alteram-se para que a planta se adapte às novas condições. De modo a estudar o efeito de diferentes *stresses* abióticos nos perfis lipofílico e fenólico das folhas de oliveira, estas foram extraídas, com hexano, metanol ou etanol, logo após terem sido submetidas a tratamentos, em separado, de seca, choque térmico ou incidência de radiação elevada de UVB, e a todos os tratamentos em simultâneo e também após um período de recuperação. Posteriormente foram identificados os metabolitos presentes nos extratos obtidos recorrendo a técnicas de cromatografia (gasosa ou líquida) acoplada à espectrometria de massa. Pelo método do DPPH[•] foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos obtidos. Foram identificados e quantificados um total de 44 compostos. Entre eles, os flavonoides, secoiridoides e alcanos, sobretudo a oleuropeína, isómero de glucósido de luteolina e alguns alcanos de cadeia longa, foram os compostos maioritários presentes nas folhas de oliveira analisadas. Quando expostas aos diferentes *stresses*, verificou-se um aumento dos flavonoides, secoiridoides e ácido quínico logo após o tratamento de *stresse*/ou depois da recuperação. Já os alcanos, ácidos gordos, terpenos, açúcares, esteróis e derivados do ácido hidroxicinâmico não se alteraram ou sofreram uma diminuição. Os resultados sugerem que os flavonoides, secoiridoides e ácido quínico desempenham um papel importante na resposta ao *stress* abiótico. A aplicação de diferentes tratamentos de *stress* pode ser uma forma interessante de controlar a produção de compostos fenólicos com interesse industrial e farmacêutico.

keywords

Antioxidant activity, drought, GC-MS, heat, LC-MS, metabolites, UVB radiation

Abstract

Olive tree, *Olea europaea* L., is a fruit tree with origin in the Mediterranean region. This species has a high economic value. Olive oil has been increasingly recognized for its health benefits. Moreover, olive leaves also presents several compounds with biological activity, such as phenolic compounds, fatty acids, terpenes, alcohols, sterols, hydrocarbons, sugars and minerals. However, due to environmental factors the metabolism and physiology of olive leaves change in order to adapt to the new conditions. To understand the effect of abiotic stresses in lipophilic and phenolic profile of olive leaves, metabolites were extracted (with hexane, methanol or ethanol) from olive leaves after the exposure to drought, heat, or enhanced UV-B radiation, applied separately and simultaneously, or after a period of stresses recovery. Metabolites were identified and quantified by chromatography (gas or liquid) coupled with mass spectrometry. By using the DPPH[•] method it was determined the antioxidant activity of the extracts. Were identified a total of 44 metabolites. The results indicate that the flavonoids, the secoiridoids and the alkanes, especially oleuropein, luteolin glucoside isomer and some long chain alkanes, are the major compounds of olive leaves. An increase of flavonoids, secoiridoids and quinic acid was verified after stress treatments and/or recover. However, the alkanes, fatty acids, terpenes, sugars, sterols and hydroxycinnamic acid were maintained or decreased. The results suggest that the flavonoids, secoiridoids and quinic acid play an important role in abiotic stress response. The application of different stress treatments can be an interesting way to control the production of compounds with industrial and pharmaceutical interest, like phenolic compounds.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
INTRODUÇÃO	1
1. <i>Olea europaea</i> L.....	1
2. Metabolitos presentes nas folhas de oliveira	3
2.1. Compostos fenólicos.....	3
2.2. Ácidos gordos	6
2.3. Terpenos	6
2.4. Álcoois e esteróis.....	8
2.5. Hidrocarbonetos.....	9
2.6. Açúcares	10
2.7. Minerais	10
3. Benefícios dos compostos presentes nos extratos das folhas de oliveira.....	11
4. Impacto de <i>stresses</i> abióticos no metabolismo das folhas de oliveira	14
4.1. Seca.....	15
4.2. Calor	16
4.3. Radiação UV.....	17
5. Extração, identificação e quantificação de compostos presentes em folhas de plantas	18
5.1. Métodos de extração	18
5.2. Métodos de identificação e quantificação de compostos presentes no extrato de folhas.....	19
5.3. Extração e quantificação de metabolitos de folhas de oliveira	20
6. Avaliação do poder antioxidante de extratos de folhas de plantas	21
OBJETIVO	23
MATERIAL E MÉTODOS	25
1. Amostras de Folhas Oliveira	25
2. Extração de Metabolitos das folhas de oliveira	26
3. Análise de metabolitos presentes nos extratos de folhas de oliveira	27
3.1. Análise do perfil lipofílico.....	27
3.2. Análise do perfil fenólico	28
4. Avaliação do poder antioxidante total de extratos de folhas de plantas	29
5. Análise estatística	29

RESULTADOS	31
1. Composição lipofílica dos extratos de folhas de oliveiras após tratamento de <i>stress</i>	31
2. Composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos de folhas de oliveiras após tratamento de <i>stress</i>	38
3. Composição lipofílica dos extratos de folhas de oliveiras após um período de recuperação dos tratamentos de <i>stress</i>	45
4. Composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos de folhas de oliveiras após um período de recuperação dos tratamentos de <i>stress</i>	51
DISCUSSÃO	58
1. Perfil de metabolitos nas folhas de oliveira da variedade Cobrançosa.....	58
2. Perfil de metabolitos e actividade total antioxidante das folhas de oliveira após exposição a <i>stresses</i> e recuperação.....	60
CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS	81
Anexo 1. Padrões utilizados na quantificação de compostos lipofílicos	81
Anexo 2. Padrões utilizados na quantificação dos compostos fenólicos	84
Anexo 3. Padrão de quercetina usado na determinação da AA	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Olea europaea</i> L. e respetiva folhagem	1
Figura 2. Estrutura da oleuropeína.....	3
Figura 3. Estrutura do hidroxitirosol.	4
Figura 4. Estruturados flavonoides presentes no extrato das folhas de oliveira	4
Figura 5. Estrutura dos derivados do ácido cinâmico encontrados na folha de oliveira.....	5
Figura 6. Estruturado ácido cafeico.....	5
Figura 7. Estrutura do ácido betulínico.....	6
Figura 8. Estrutura dos ácidos terpénicos encontrados no extrato de folhas de oliveira	7
Figura 9. Estrutura dos diálcoois presentes nas folhas de oliveira	7
Figura 10. Estrutura das vitaminas presentes no extrato das folhas de oliveira	8
Figura 11. Estrutura dos esteróis presentes nas folhas de oliveira.....	9
Figura 12. Estruturados açúcares presentes no extrato das folhas de oliveira	10
Figura 13. Esquema de GC-MS e LC-MS.....	20
Figura 14. Reação entre o radical DPPH [•] e o composto antioxidante	21
Figura 15. Exemplo de um dos cromatogramas obtidos por GC-MS dos extratos de hexano	31
Figura 16. Representação gráfica do total de açúcares, esteróis, triterpenos, ácidos gordos e alcanos (g/Kg PS) presentes nas folhas de oliveira de cada tratamento	34
Figura 17. Percentagem de alcanos e ácidos gordos presentes nas folhas de oliveira em cada tratamento.....	35
Figura 18. Percentagem de terpenos e esteróis presentes nas folhas de oliveira em cada tratamento.	36
Figura 19. Percentagem de açúcares e polióis presentes nas folhas de oliveira em cada tratamento	37
Figura 20. Exemplo de um dos cromatogramas obtidos por LC-MS, dos extratos de etanol de folhas de oliveira após recuperação ao tratamento de <i>stress</i>	38
Figura 21. Representação gráfica do total de derivados do ácido hidroxicinâmico, ácidos carboxílicos, secoiridoides, e flavonoides (g/Kg PS) presentes nas folhas de oliveira de cada tratamento.....	42
Figura 22. Percentagem de flavonoides e secoiridoides presentes nas folhas de oliveira em cada tratamento	42
Figura 23. Percentagem de ácidos carboxílicos e derivados do ácido hidroxicinâmico presentes nas folhas de oliveira em cada tratamento.....	44
Figura 24. Representação gráfica do total de esteróis, açúcares, terpenos, ácidos gordos e alcanos (g/Kg PS) presentes nas folhas de oliveira após o período de recuperação de cada tratamento.....	48
Figura 25. Percentagem de alcanos e ácidos gordos presentes nas folhas de oliveira após o período de recuperação de cada tratamento.	49
Figura 26. Percentagem de terpenos presentes nas folhas de oliveira após o período de recuperação de cada tratamento	50
Figura 27. Percentagem açúcares e polióis presentes nas folhas de oliveira após o período de recuperação de cada tratamento	51

Figura 28. Representação gráfica do total de derivados do ácido hidroxicinâmico, ácidos carboxílicos, secoiridoides, e flavonoides (g/Kg PS) presentes nas folhas de oliveira após o período de recuperação	55
Figura 29. Percentagem de flavonoides presentes nas folhas de oliveira após período de recuperação	55
Figura 30. Percentagem de secoiridoides e ácidos carboxílicos presentes nas folhas de oliveira após período de recuperação.....	56
Figura 31. Alterações verificadas nos alcanos presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos	60
Figura 32. Alterações verificadas nos terpenos presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos.	61
Figura 33. Alterações verificadas nos ácidos gordos presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos	62
Figura 34. Alterações verificadas nos esteróis presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos	63
Figura 35. Alterações verificadas nos açúcares presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos	64
Figura 36. Alterações verificadas nos flavonóides e derivados do ácido hidroxixinâmico presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos	65
Figura 37. Alterações verificadas nos secoiridoides presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos	66
Figura 38. Alterações verificadas nos polifenóis presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos	67
Figura 39. Esquema síntese das alterações verificadas nas principais famílias de compostos identificados nas folhas de oliveiras logo após os tratamentos de stress e após o período de recuperação.	69
Figura 40. Representação gráfica da AA (mg equiv quercetina mg ⁻¹ PS) dos extratos fenólicos obtidos de folhas de oliveira expostas a cada tratamento bem como a sua composição fenólica (g/Kg PS)	70
Figura 41. Reta de calibração de octadecano (padrão utilizado para a quantificação de alcanos)	81
Figura 42. Reta de calibração de ácido palmítico (padrão utilizado para a quantificação de ácidos gordos).....	82
Figura 43. Reta de calibração de colesterol (padrão utilizado para a quantificação de esteróis e terpenos)	82
Figura 44. Reta de calibração de colesterol (padrão utilizado para a quantificação de esteróis e terpenos)	83
Figura 45. Reta de calibração de ácido cafeico (padrão utilizado para a quantificação de derivados do ácido hidroxicinâmico e de secoiridoides).	84
Figura 46. Reta de calibração de ácido ursólico (padrão utilizado para a quantificação de ácidos carboxílicos).	85
Figura 47. Reta de calibração de quercetina (padrão utilizado para a quantificação de flavonoides).	85
Figura 48. Reta de calibração de quercetina (padrão utilizado para a determinação da AA).	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição lipofílica dos extratos de folhas de oliveira (g/Kg PS) de cada tratamento	32
Tabela 2. Composição fenólica dos extratos de folhas de oliveira (g/Kg PS) de cada tratamento.....	39
Tabela 3. Atividade antioxidante (mg equiv quercetina mg^{-1}) do perfil fenólico de cada extrato de folhas de oliveira de cada tratamento.	45
Tabela 4. Composição lipofílica dos extratos de folhas de oliveira (g/Kg PS) após recuperação de cada tratamento.	46
Tabela 5. Composição fenólica dos extratos de folhas de oliveira (g/Kg PS) após recuperação de cada tratamento .	52
Tabela 6. Atividade antioxidante (mg equiv quercetina mg^{-1} extrato) do perfil fenólico de cada extrato de folhas de oliveira após o período de recuperação de cada tratamento	57
Tabela 7. Registo da A/A_{pi} média para cada concentração de octadecano (mg/mL).....	81
Tabela 8. Registo da A/A_{pi} média para cada concentração de ácido palmítico (mg/mL).....	81
Tabela 9. Registo da A/A_{pi} média para cada concentração de maltose (mg/mL).	82
Tabela 10. Registo da A/A_{pi} média para cada concentração de colesterol (mg/mL).	83
Tabela 11. Registo da Área média para cada concentração de ácido cafeico (mg/mL).	84
Tabela 12. Registo da área média para cada concentração de ácido ursólico (mg/mL).	84
Tabela 13. Registo da área média para cada concentração de quercetina (mg/mL).	85
Tabela 14. Registo da absorvência média para cada concentração de quercetina.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

A/A_{pi} – razão área do pico/área do pico do padrão interno

AA – atividade antioxidante

ABTS - 2,29-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

AH –composto antioxidante

A_{pi} – área do pico correspondente ao padrão interno

Bax – do inglês *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2 – do inglês *B-cell lymphoma 2*

BSTFA - bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

C – grupo de controlo

Ca²⁺ - ião cálcio

Cl⁻ - ião cloro

C_R – recuperação de C: grupo de plantas de controlo após um período de recuperação

CT – Choque Térmico: grupo de plantas submetido a um choque térmico

CT_R – recuperação de CT: grupo de plantas submetido a um choque térmico seguido de um período de recuperação

DAD - detetor de foto-díodos, do inglês *Diode Array Detector*

DAHP - 3-deoxi-D-arabinoeptulose 7-fosfato

DNA - ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

DPPH[•] - 2,2-difenil-picril-hidrazilo

Equiv - equivalente

ESI - ionização por *electrospray*, do inglês *Electrospray ionization*

Ex. – exemplo

FID - detetor por ionização de chama, do inglês *Flame Ionization Detector*

FN-κB - factor nuclear *kappa B*

FRAP - poder antioxidante por redução do ião férrico, do inglês *Fluorescence Recovery After Photobleaching*

GC - cromatografia gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

HIV-1 - vírus da imunodeficiência humana 1, do inglês *Human Immunodeficiency Virus 1*

HPLC - cromatografia líquida de elevada eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

INE – Instituto Nacional de Estatística

K⁺ - ião potássio

LC – cromatografia líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LDL – lipoproteínas de baixa densidade, do inglês *Low Density Lipoprotein*

m/z – Razão massa/carga

MS – Espectrometria de massa, do inglês *Mass Spectrometry*

Na⁺ - íão sódio

ORAC - capacidade de absorção do radical oxigénio, do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

P - fosfato

PEP – fosfoenolpiruvato

PI – Padrão Interno

PS – Peso Seco

R[•] - Radical livre R

R² – coeficiente de correlação

S – Seca: grupo de plantas submetido a *stress* hídrico

S + CT + UVB – grupo de plantas expostas aos vários *stresses* em simultâneo

S + CT + UVB_R – recuperação de S + CT + UVB: grupo de plantas submetidas vários *stresses* em simultâneo seguido de um período de recuperação

S_R – recuperação de S: grupo de plantas submetidas a *stress* hídrico após um período de recuperação

TOF – tempo de voo, do inglês *Time Of Flight*

TMSCL – trimetilsilil cloramida

UHPLC-MS - Utra-Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa, do inglês *Ultra-High Pressure LC-MS*

UV – Ultravioleta

UVB – (radiação UVB) Ultravioleta B

UVB – (tratamento UVB) grupo de plantas expostas a radiação elevada de UVB

UVB_R – recuperação de UVB: grupo de plantas expostas a radiação elevada de UVB seguido de um período de recuperação

WHO – do inglês *World Health Organization*

INTRODUÇÃO

1. *Olea europaea* L.

A oliveira, *Olea europaea* L. (figura 1), é uma árvore de fruto nativa do Mediterrâneo, trata-se da espécie mais popular pertencente ao género *Olea*. É uma árvore de grande longevidade e amplamente distribuída, uma vez que se trata de uma cultura muito resistente à seca e a doenças (Eurostat, 2015). Existem diversas variedades de oliveira, sendo a Galega, Cobrançosa, Maçanilha, Carrasquenha, Redondil, Blanqueta, Azeiteira, Cordovil, Madural, Negrinha e Verdeal as variedades típicas de Portugal (Gemas *et al.*, 2004). Cada variedade tem características diferentes, diferindo entre elas a capacidade de adaptação e resistência a vários *stresses*, nomeadamente variação de temperatura, seca e exposição a radiação (Gemas *et al.*, 2004).



Figura 1. *Olea europaea* L. e respetiva folhagem

A oliveira é uma das principais culturas a nível nacional a par com o milho, a batata e a maçã (INE, 2014). A área de olival em Portugal corresponde a mais de 335 mil hectares e cerca de 4,65 milhões de hectares na Europa, onde mais de 99% da produção se concentra em Espanha, Itália, Grécia e Portugal (Eurostat, 2015; INE, 2014). A oliveira é uma das mais importantes e antigas culturas, conhecida pelo seu fruto e, sobretudo, pelo

seu óleo, o azeite. A oliveira é cada vez mais reconhecida e valorizada desempenhando um importante papel na economia nacional, estando Portugal, em 2016, no quarto lugar dos maiores fornecedores de azeite a nível mundial (International Olive Council, 2016).

O azeite tem demonstrado ser um alimento com benefícios para a saúde, nomeadamente a nível cardiovascular (Estruch *et al.*, 2013). Existem estudos que demonstram também que a integração do azeite na dieta tem benefícios no controlo da diabetes, bem como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (Ceriello *et al.*, 2014). Devido aos benefícios para a saúde que lhe são associados, a Organização Mundial de Saúde recomenda o consumo de azeite e outras gorduras insaturadas em detrimento das gorduras saturadas (WHO, 2015).

A azeitona de mesa é também um produto importante obtido da oliveira, desempenhando similarmente um papel significativo na economia. Os grandes produtores e exportadores mundiais deste fruto concentram-se na Europa, estando Portugal em terceiro lugar no *ranking* de exportação, depois de Espanha e Grécia (International Olive Council, 2012).

Além do fruto e do óleo dele obtido, também as folhas da oliveira têm grande aplicabilidade como infusões ou extratos, na medicina, e nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar. Na medicina tradicional, as folhas de oliveira são desde há muito usadas no tratamento de várias doenças tais como diabetes, doenças cardiovasculares e no combate a infeções, efeitos que têm vindo a ser cientificamente comprovados (Ben Salem *et al.*, 2015).

A nível alimentar, as folhas podem estar presentes na extração do óleo das azeitonas, conferindo ao azeite um aumento dos compostos antioxidantes, aumentando a estabilidade do produto, mantendo a sua qualidade e características sensoriais (Sonda *et al.*, 2014). Também os extratos obtidos a partir das folhas de oliveira podem ser usados na prevenção da oxidação de outros óleos e apresentam-se como uma potencial fonte de antioxidantes a ser incorporada em embalagens de alimentos perecíveis (Bouaziz *et al.*, 2008; Marcos *et al.*, 2014).

2. Metabolitos presentes nas folhas de oliveira

O interesse das folhas de oliveira deve-se sobretudo aos metabolitos secundários presentes que lhes conferem benefícios para a saúde, o que valoriza cada vez mais este subproduto. A presença e quantidade de certos metabolitos nas folhas de oliveira não é constante, dependem da variedade, da região em que se encontra, do estado de desenvolvimento, entre outros (Brahmi *et al.*, 2014; Guinda *et al.*, 2010; Malheiro *et al.*, 2016; Taamalli *et al.*, 2012). Já a composição dos extratos depende ainda dos métodos e condições de extração utilizadas (Taamalli *et al.*, 2012). Nas folhas estão presentes diversos metabolitos, como compostos fenólicos, ácidos gordos, terpenos, álcoois, esteróis, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, açúcares e minerais.

2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas que lhes conferem alguma proteção e contribuem para as características sensoriais dos seus produtos (Andrewes *et al.*, 2003). Nas folhas de oliveira estão presentes uma grande diversidade de compostos fenólicos, como secoiridoides, flavonoides, lenhanos, fenóis simples e derivados do ácido cinâmico (Fu *et al.*, 2010; Kiritsakis *et al.*, 2010).

Nos extratos de folhas de oliveira, o composto fenólico que mais se destaca por ser o mais abundante é a oleuropeína (Fu *et al.*, 2010; Kiritsakis *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2007). A oleuropeína, cuja estrutura se encontra representada na figura 2, pertence ao grupo dos secoiridoides. Além da oleuropeína também estão nas folhas alguns dos seus glucósidos e derivados (Fu *et al.*, 2010; Kiritsakis *et al.*, 2010).

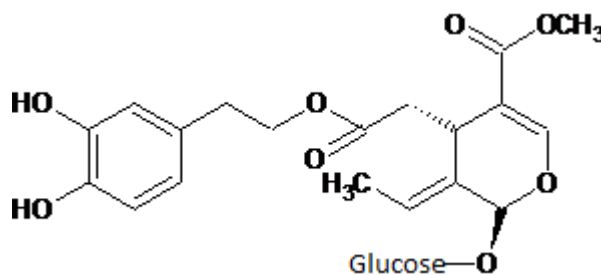


Figura 2. Estrutura da oleuropeína.

O hidroxitirosol, representado na figura 3, é o fenol simples presente nas folhas de oliveira que tem sido mais descrito (Fu *et al.*, 2010). Este composto tem como precursores a oleuropeína e seus derivados.

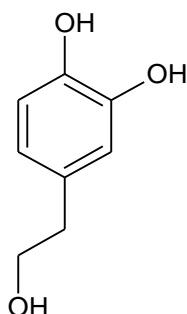
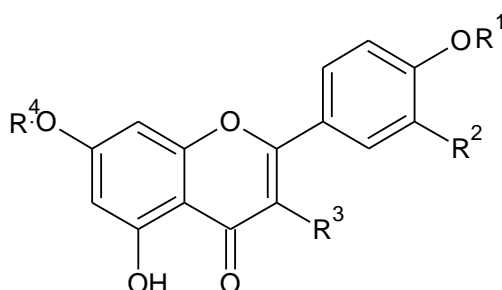


Figura 3. Estrutura do hidroxitirosol.

Os flavonoides são outro grupo de compostos fenólicos identificados nos extratos de folhas de oliveira. Neste grupo encontram-se compostos como a rutina, apigenina, apigenina-7-*O*-glicósido, glicósidos de luteolina e quercetina, representados na Figura 4 (Fu *et al.*, 2010; Kiritsakis *et al.*, 2010; Meirinhos *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007).



- A. $R^1 = H; R^2 = H; R^3 = H; R^4 = \text{glucose}$
- B. $R^1 = H; R^2 = OH; R^3 = H; R^4 = \text{glucose}$
- C. $R^1 = \text{glucose}; R^2 = OH; R^3 = H; R^4 = H$
- D. $R^1 = H; R^2 = OH; R^3 = OH; R^4 = H$

Figura 4. Estruturados flavonoides presentes no extrato das folhas de oliveira: apigenina-7-*O*-glicósido (A), luteolina-7-*O*-glicósido (B), luteolina-4'-*O*-glicósido (C) e quercetina (D).

No grupo de derivados do ácido cinâmico fazem parte dois isómeros, verbascósido (ou acteósido) e isoacteósido, e o ácido *para*-cumárico (Fu *et al.*, 2010; Kiritsakis *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2007). A estrutura de ambos os compostos encontra-se representada na Figura 5.

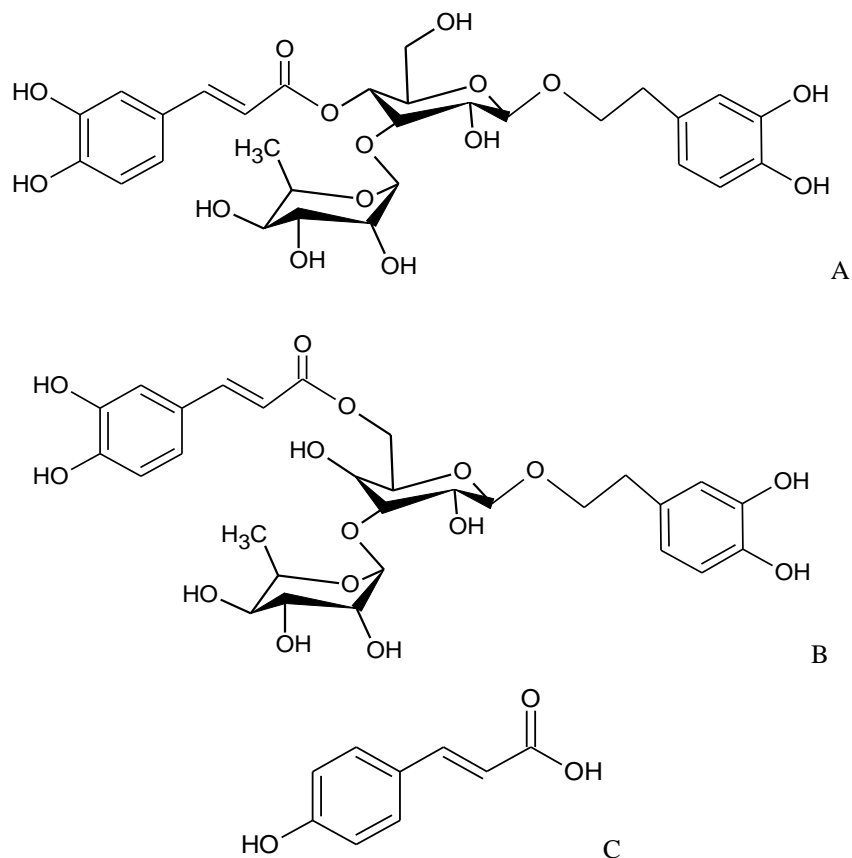


Figura 5. Estrutura dos derivados do ácido cinâmico encontrados na folha de oliveira: verbascósido (A), isoacteosido (B) e ácido *para*-cumárico (C).

Por fim, entre os compostos fenólicos, é possível ainda detetar nas folhas de oliveira a presença de ácido cafeico, representado na Figura 6 (Meirinhos *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007).

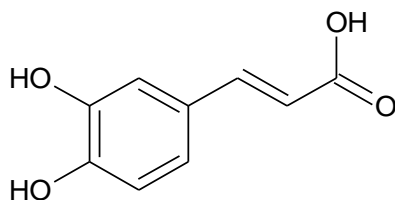


Figura 6. Estruturado ácido cafeico.

2.2. Ácidos gordos

Nas folhas de oliveira foram identificados diversos ácidos gordos, sendo esta uma interessante fonte de ácidos gordos polinsaturados. Na verdade, enquanto no azeite o ácido gordo predominante é o ácido oleico (C18:1), que é monoinsaturado, nas folhas predomina o ácido linolénico (C18:3), um ácido gordo ómega 3 polinsaturado (Cavalheiro *et al.*, 2015).

Além dos ácidos linolénico e oleico, também se encontram grandes quantidades de ácido palmítico (C16:0), que é um ácido gordo saturado (Cavalheiro *et al.*, 2015). Outros ácidos gordos saturados presentes em menores quantidades são o ácido esteárico (C18:0), o ácido mirístico (C14:0) e o ácido araquídico (C20:0).

2.3. Terpenos

Os terpenos conferem algumas propriedades benéficas às folhas. São encontrados, sobretudo, cinco compostos terpénicos pentacíclicos, ácido oleanólico, ácido maslínico, ácido ursólico, uvaol e eritradiol, e também as vitaminas A e E (Guinda *et al.*, 2010; Issaoui *et al.*, 2014; Olmo-García *et al.*, 2016; Tabera *et al.*, 2004). Pode também ser identificado o ácido betulínico, representado na Figura 7, no entanto, este ácido terpénico está apenas presente nos primeiros tempos de vida da planta (Guinda *et al.*, 2010).

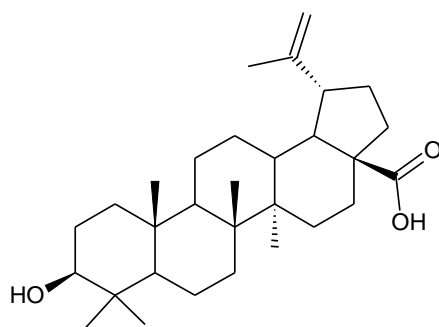


Figura 7. Estrutura do ácido betulínico.

O ácido oleanólico é o terpeno que se encontra em maior quantidade nas folhas de oliveira (Guinda *et al.*, 2010, 2015; Olmo-García *et al.*, 2016; Romero *et al.*, 2016). Seguem-se o ácido maslínico e o ácido ursólico (Guinda *et al.*, 2010, 2015; Olmo-García *et al.*, 2016). Todos estes compostos são ácidos terpênicos e a sua estrutura encontra-se representada na Figura 8.

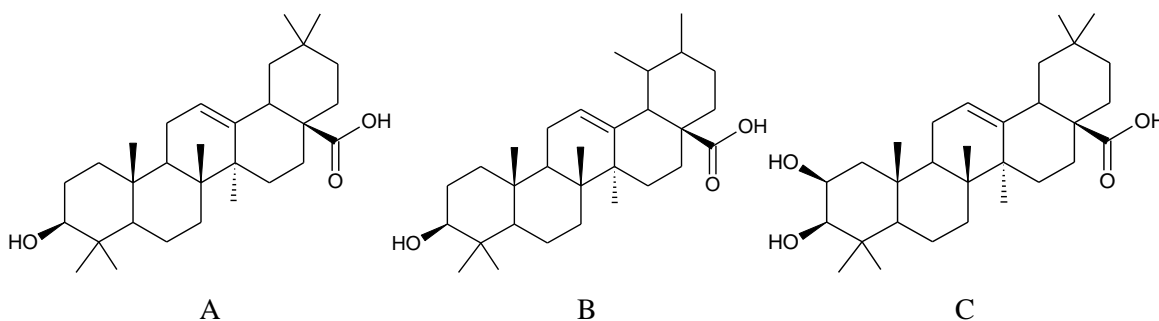


Figura 8. Estrutura dos ácidos terpênicos encontrados no extrato de folhas de oliveira: ácido oleanólico (A), ácido ursólico (B) e ácido maslínico (C).

O uvaol e o eritrodiol são dois diálcoois terpênicos representados na Figura 9. Estes terpenos são precursores na biossíntese dos ácidos oleanólico e ursólico e, geralmente, estão presentes nas folhas em menor quantidade (Guinda *et al.*, 2010, 2015; Olmo-García *et al.*, 2016).

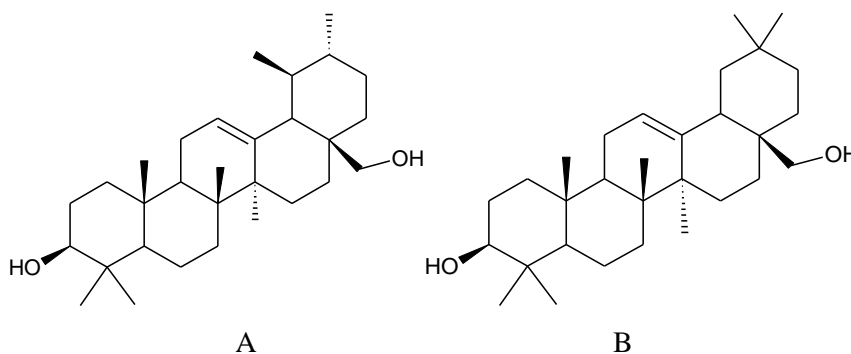


Figura 9. Estrutura dos diálcoois presentes nas folhas de oliveira: uvaol (A) e eritrodiol (B).

Nas folhas podem encontrar-se também uma forma da vitamina E e um precursor da vitamina A, respetivamente α -tocoferol e β -caroteno, representados na Figura 10. A vitamina E corresponde a oito compostos diferentes, tocoferóis e tocotrienóis, que ocorrem naturalmente nas plantas. O α -tocoferol é a forma da vitamina E encontrada em extratos de

folhas de oliveira e corresponde à forma mais ativa desta vitamina (Issaoui *et al.*, 2014; Tabera *et al.*, 2004). A vitamina A corresponde a três retinóides e tem duas pró-vitaminas, sendo o carotenóide β -caroteno a pró-vitamina precursora da vitamina A encontrada nas folhas de oliveira (Tabera *et al.*, 2004).

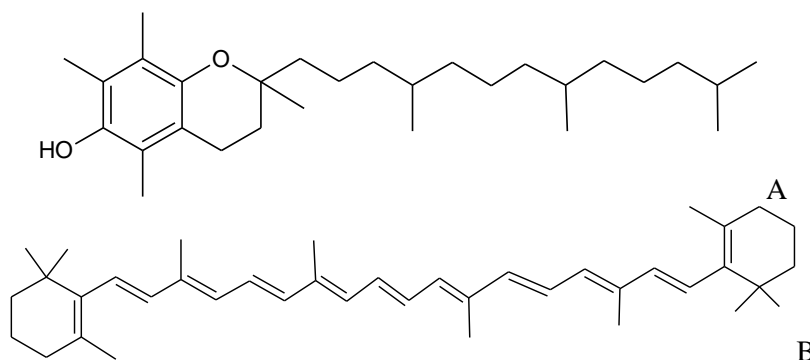


Figura 10. Estrutura das vitaminas presentes no extrato das folhas de oliveira: α -tocoferol (A) e β -caroteno (B).

2.4. Álcoois e esteróis

Existem poucas referências na literatura onde é feita a identificação dos álcoois e esteróis presentes nas folhas de oliveira. Geralmente, tanto álcoois como esteróis estão presentes em concentrações mais elevadas no fruto do que na folha (Orozco-Solano *et al.*, 2010a).

No que aos álcoois diz respeito, nas folhas encontram-se apenas álcoois com um número par de átomos de carbono. O álcool predominante nas folhas é o hexacosanol ($C_{26}H_{54}O$) (Orozco-Solano *et al.*, 2010a, 2010b). Outro álcool que se destaca é o octacosanol ($C_{28}H_{58}O$), devido às suas propriedades bioativas. Ainda estão presentes, em quantidades geralmente inferiores, os álcoois tetracosanol ($C_{24}H_{50}O$) e docosanol ($C_{22}H_{46}O$).

Quanto aos esteróis presentes nas folhas, o β -sitosterol é o mais abundante, seguido do campesterol e estigmasterol, cujas estruturas se encontram representadas na Figura 11 (Orozco-Solano *et al.*, 2010a, 2010b). Mas estão também presentes menores quantidades de outros compostos como colesterol e Δ^5 - e Δ^7 -avenasterol.

A

B

C

Figura 11. Estrutura dos esteróis presentes nas folhas de oliveira: β -sitosterol (A), campesterol (B) e estigmasterol (C).

2.5. Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos presentes nas folhas de oliveira são sobretudo alcanos (hidrocarbonetos alifáticos), importantes na constituição das ceras, e hidrocarbonetos aromáticos. Sabe-se que a presença de alcanos difere bastante entre a folha e o fruto (Mihailova *et al.*, 2015). No fruto a composição de alcanos varia ao longo do amadurecimento, predominando, no fruto maduro, alcanos de cadeia curta, enquanto nas folhas a composição é mais constante e predominam os alcanos de cadeia longa, pelo que os azeites produzidos na presença de folhas contêm mais alcanos de cadeia longa (Mihailova *et al.*, 2015).

Os alcanos presentes nos extratos de folhas de oliveira caracterizam-se pela longa cadeia de átomos de carbono que varia entre os 24 e os 35 átomos de carbono (Issaoui *et al.*, 2014; Mihailova *et al.*, 2015). Verifica-se, no entanto, uma predominância dos homólogos ímpares com 29, 31 e 33 átomos de carbono, respetivamente, nanocosano ($C_{29}H_{60}$), untriacontano ($C_{31}H_{64}$) e tritriacontano ($C_{33}H_{68}$). Por outro lado existem, em menor quantidade hidrocarbonetos com cadeias pares de 30 e 32 átomos de carbono, triacontano ($C_{30}H_{62}$) e dotriacontano ($C_{32}H_{66}$).

Os hidrocarbonetos aromáticos presentes nos extratos de folhas de oliveira são três: tolueno e *orto*- e *para*-xileno (Malheiro *et al.*, 2016). O tolueno encontra-se em quantidades muito superiores às dos restantes hidrocarbonetos aromáticos.

2.6. Açúcares

As folhas são o local onde predominantemente se realiza a fotossíntese, ou seja, é o local onde são produzidos os açúcares. Estes compostos são não só uma fonte de energia e precursores de outros compostos mas também são um importante constituinte da parede celular e fazem parte dos solutos que contribuem para o ajuste osmótico (Gómez-González *et al.*, 2010). Os açúcares predominantes nas folhas incluem dois monossacarídeos e um poliol, respetivamente, glucose, frutose e manitol (Gómez-González *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2016; Romero-García *et al.*, 2016). Foram também descritos outros componentes importantes como celulose (polímero de glucose) e açúcares hemicelulósicos (não estruturais) como arabinose, galactose e xilose (Romero-García *et al.*, 2016). Na Figura 12 encontram-se representados os açúcares referidos.

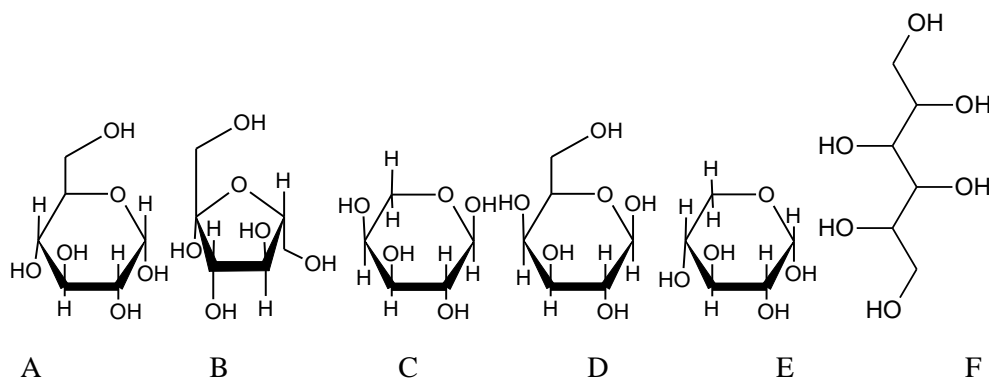


Figura 12. Estruturados açúcares presentes no extrato das folhas de oliveira: glucose (A), frutose (B), arabinose (C), galactose (D), xilose (E), manitol (F).

2.7. Minerais

Além de todos os compostos acima referidos, também os minerais estão presentes nas folhas em quantidades apreciáveis. Os minerais podem ser divididos em dois grupos os macroelementos e os microelementos. No primeiro grupo encontra-se o azoto, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, o segundo refere-se ao ferro, zinco, cobre e manganês

(Cetinkaya *et al.*, 2016). Apesar de ser necessário verificar a biodisponibilidade dos minerais, é sabido que 50 g de folhas de oliveira contêm 100% da dose diária recomendada de ferro e de cobre e contém também quantidades relativamente elevadas de outros minerais como cálcio e manganês (Cavalheiro *et al.*, 2015).

3. Benefícios dos compostos presentes nos extratos das folhas de oliveira

Devido aos metabolitos presentes nas folhas, os seus extratos apresentam propriedades que lhes conferem um valor muito elevado. Os compostos fenólicos, os ácidos gordos, os terpenos, as vitaminas e pró-vitaminas e até os açúcares são compostos que conferem aos extratos das folhas algumas vantagens biológicas.

Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pelos benefícios antioxidantes encontrados nos extratos de folhas de oliveira, sobretudo devido ao seu elevado poder redutor (Kiritsakis *et al.*, 2010; Kontogianni e Gerothanassis, 2012). Esta propriedade permite que os extratos de folhas sejam utilizados como ingrediente alimentar, natural e seguro, que previne a oxidação lipídica (Leonardis *et al.*, 2008). Salta *et al.* (2007), Bouaziz *et al.* (2008) e Botsoglou *et al.* (2014) demonstraram que a adição de extratos de oliveira ricos em oleuropeína, hidroxitirosol e quercetina aumenta a estabilidade oxidativa dos óleos e carne. A oxidação dos lípidos presentes nos óleos propaga-se por reações em cadeia que podem ser inibidas pelos compostos das folhas de oliveira (Salta *et al.*, 2007). A adição de extratos de folhas a azeites aumenta os níveis de oleuropeína e em geral favorece as suas características nutracêuticas (Pacetta, 2013). Estudos demonstraram que a adição de folhas de oliveira na ração de animais tem um impacto positivo na qualidade microbiológica da carne obtida, devido à ação da oleuropeína e hidroxitirosol (Marangoni *et al.*, 2015). Os extratos de folhas de oliveira podem também ser usados na indústria alimentar, nomeadamente no fabrico de salsichas, melhorando também a qualidade microbiológica, a estabilidade da cor e o tempo de prateleira (Alirezalu *et al.*, 2016).

A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos do extrato das folhas de oliveira foi demonstrada contra alguns fungos e bactéria, responsáveis por infeções

intestinais e respiratórias (Leonardis *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2007). Existem ainda estudos que demonstram a eficácia do extrato das folhas rico em oleuropeína, ácido oleico e hidroxitirosol na inibição da infecção e transmissão do vírus HIV-1, em parte devido à indução da apoptose celular, mas também revertendo os danos causados pelo vírus a nível da expressão de genes envolvidos nas vias sinalizadoras de sobrevivência, morte, diferenciação e proliferação celular (Lee-Huang *et al.*, 2003).

Além da atividade antioxidante, extratos das folhas de oliveira ricos em compostos polifenólicos têm ainda alguns benefícios metabólicos, devido ao seu efeito anti-inflamatório, o que torna o extrato num componente da dieta benéfico e saudável (Jemai *et al.*, 2008; Poudyal *et al.*, 2010). Existem estudos, *in vivo*, que comprovam que a ingestão de extrato de folhas de oliveira trás benefícios a nível da regulação da glucose, da deposição de gordura e da concentração de LDL e colesterol total, bem como a nível da redução da peroxidação lipídica, mesmo em dietas contendo um elevado teor de gordura e hidratos de carbono (Jemai *et al.*, 2008; Poudyal *et al.*, 2010). Esta ação deve-se sobretudo aos compostos oleuropeína, aglicona da oleuropeína e hidroxitirosol (Jemai *et al.*, 2008). A oleuropeína é também descrita como sendo responsável por fortificar o sistema imunitário através da estimulação da produção de macrófagos (Galli e Caruso, 2002). No mercado encontram-se disponíveis suplementos alimentares (comprimidos) ricos em oleuropeína proveniente de folhas de oliveira, é o caso da marca *Solgar*.

O extrato de folhas de oliveira apresenta também algum potencial anticancerígeno contra diferentes tipos de células cancerígenas, nomeadamente cancro da mama, do colon e leucemia (Abaza *et al.*, 2007; Anter *et al.*, 2011; Taamalli *et al.*, 2012). O efeito anticancerígeno deve-se sobretudo à presença de apigenina, oleuropeína e luteolina (Abaza *et al.*, 2007; Anter *et al.*, 2011). Enquanto a apigenina e a oleuropeína regulam a diferenciação celular, a luteolina promove a apoptose (Abaza *et al.*, 2007; Anter *et al.*, 2011). Em outros estudos, a luteolina é também referida como tendo uma grande atividade antialérgica (Sabry, 2014).

Os ácidos gordos polinsaturados apresentam grandes benefícios na saúde humana. Tanto a nível da prevenção de doenças cardiovasculares como a nível da regulação da inflamação de adipócitos, associada à obesidade (Maehre *et al.*, 2015; Wang e Huang, 2015). O ácido linolénico trata-se de um ácido gordo ómega 3 proveniente das plantas,

presente também nas folhas de oliveira. A sua ingestão ajuda na regulação dos níveis de triglicéridos e ácidos gordos no plasma, bem como no controlo da pressão arterial (Sala-Vila *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016).

Os terpenos também apresentam boas propriedades biológicas, contribuindo também para a atividade antioxidante das folhas de oliveira (Allouche *et al.*, 2010). O uvaol e o eritradiol destacam-se pelo potencial na diminuição da formação de trombos (Allouche *et al.*, 2010). O ácido maslínico é também responsável por reduzir a neuroinflamação em astrócitos corticais *in vitro* através da inibição da via de transdução de sinal do fator nuclear κ B (FN- κ B) (Huang *et al.*, 2011). Já o ácido oleanólico intervém na estabilização dos níveis de glucose, através da regulação dos níveis de insulina e da inibição da enzima α -glucosidase (Castellano *et al.*, 2016).

Os terpenos encontrados nas folhas de oliveira também têm uma potencial aplicação no combate a diversos tipos de cancro, nomeadamente cancro do colon e da mama, onde ensaios *in vitro* demonstraram os efeitos anticancerígenos, antiproliferativos e na redução dos danos no DNA (Allouche *et al.*, 2011; Rufino-Palomares *et al.*, 2013). O eritradiol e o ácido maslínico promovem a apoptose, devido à sua atuação na expressão de proteínas do citoesqueleto e de proteínas que regulam a apoptose (Bcl-2, Bax, citocromo c e caspases 9 e 3) (Allouche *et al.*, 2011; Rufino-Palomares *et al.*, 2013). Já o uvaol e o ácido oleanólico induzem a paragem do ciclo celular (Allouche *et al.*, 2011).

As vitaminas são compostos essenciais no organismo para o desempenho das funções fisiológicas. A vitamina A, uma das vitaminas presentes nas folhas de oliveira, está geralmente associada à visão e diferenciação das células epiteliais (Green e Fascetti, 2016). Por outro lado, a vitamina E é conhecida sobretudo devido à sua capacidade antioxidante, sendo as suas funções descritas por Traber e Atkinson (2007).

O octacosanol apresenta alguns efeitos bioativos sem no entanto apresentar toxicidade, tendo potencial no tratamento de algumas patologias (Wang *et al.*, 2010). Este composto tem efeito no alívio da dor, da inflamação e na redução do triacilglicerol comprovados *in vivo* (Oliveira *et al.*, 2012). Além disso, o octacosanol é um possível agente no tratamento da doença de Parkinson, devido ao seu efeito neuroprotetor que

previne a apoptose dos neurónios dopaminérgicos, que é a causa da doença (Wang *et al.*, 2010).

Os esteróis presentes nas plantas são conhecidos pelo efeito na redução do colesterol e do LDL. É também sabido que a sua atuação na redução do colesterol se deve à proximidade da estrutura destes esteróis e a do colesterol, assim ambos são incorporados em micelas para permitir a absorção o que cria uma competitividade pela ligação à micela reduzindo a absorção do colesterol em prol da absorção dos esteróis (Marangoni e Poli, 2010).

Outro composto presente nas folhas de oliveira que lhes dá alguma vantagem é o manitol. O manitol é um poliol derivado de açúcar presente em quantidades significativas nas folhas de oliveira, podendo ter aplicabilidade na indústria como adoçante de baixas calorias (Guinda *et al.*, 2015).

Devido a todas estas propriedades bioativas apresentadas pelo extrato de folhas de oliveira, este extrato pode ser incorporado diretamente na dieta ou usado como fonte de alguns compostos bioativos. No entanto, há que ter em atenção a quantidade e concentração do extrato uma vez que contém compostos fenólicos e terpenos que podem apresentar também alguma atividade citotóxica, quando administrados em doses mais elevadas.

4. Impacto de *stresses* abióticos no metabolismo das folhas de oliveira

As plantas estão sujeitas às condições ambientais que podem afetar o seu desenvolvimento. Fatores físico-químicos como temperatura, quantidade de água disponível (excesso ou défice), radiação incidente, salinidade, têm influência no metabolismo das plantas e desempenham um papel importante na sua distribuição (Monteiro-Henriques e Espírito-Santo, 2011). Alterações repentinas no clima podem afetar a fauna e flora de uma dada região e requerem respostas rápidas por parte das plantas de forma a sobreviverem (Monteiro-Henriques e Espírito-Santo, 2011; Pachauri *et al.*, 2015).

Portugal tem um clima tipicamente mediterrânico ao qual a oliveira, como planta típica desta região, se encontra adaptada. No entanto, prevê-se que, tal como tem vindo a acontecer nas últimas décadas, continuem a ocorrer alterações no clima, nomeadamente na temperatura, na incidência de radiação UV e na precipitação e secas (Pachauri *et al.*, 2015). Estas mudanças implicam a adaptação das plantas, nomeadamente a nível metabólico com consequente modificação na produção e presença de metabolitos na planta (Monteiro-Henriques e Espírito-Santo, 2011). Assim é esperado que, com a alteração dos fatores abióticos, o teor dos metabolitos seja afetado.

4.1. Seca

A água é um composto essencial à vida uma vez que é indispensável para que ocorram inúmeras reações metabólicas. Trata-se de um composto muito abundante no planeta Terra, no entanto a água doce corresponde apenas a 2,5%, dos quais 30,8% correspondem à água doce na forma sólida, 68,9% encontram-se em lençóis freáticos e pântanos e os restantes 0,3% correspondem à água disponível em lagos e rios (Franks, 2000).

As alterações climáticas têm conduzido a alterações no ciclo hídrico (Franks, 2000). Existem previsões de que haverá uma diminuição da precipitação e na disponibilidade de água, sobretudo no sul do país, o que leva ao aumento das secas e do *stress* hídrico (Mourato *et al.*, 2015). A seca e o *stress* hídrico afetam a viabilidade das plantas que, devido às suas capacidades de adaptação, podem conseguir resistir mesmo em condições adversas mantendo a produtividade à custa de alterações morfológicas, anatómicas, fisiológicas e bioquímicas.

A oliveira é uma planta muito tolerante à seca, devido ao controlo da absorção e da transpiração através do desenvolvimento radicular e da diminuição da abertura estomática (Rossi *et al.*, 2013). Estas adaptações permitem à oliveira manter a produção do fruto, mesmo com défice de água, no entanto, leva a uma perda da folhagem, uma vez que não há equilíbrio entre as folhas novas em desenvolvimento e as que caem (Gómez-del-Campo,

2013). A nível metabólico também ocorrem alterações que permitem à oliveira adaptar-se à baixa disponibilidade hídrica.

A falta de água provoca alterações nos ácidos gordos presentes nas folhas havendo, de modo geral, um aumento dos ácidos gordos insaturados, ou seja, no ácido linolénico e, simultaneamente, um decréscimo nos ácidos esteárico e oleico (Guerfel *et al.*, 2008). Verificam-se também, a nível das folhas, uma diminuição no teor relativo em água e na taxa fotossintética e um aumento nos danos provocados pelo *stress* oxidativo, nomeadamente aumento da peroxidação lipídica e degradação de pigmentos (Bacelar *et al.*, 2006; Guerfel *et al.*, 2009a, 2009b). Como defesa contra o *stress* oxidativo, a oliveira aumenta a concentração de fenóis totais, amido e proteínas solúveis, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes (Ahmed *et al.*, 2009; Bacelar *et al.*, 2006; Ennajeh *et al.*, 2009). Outros mecanismos desencadeados pela oliveira, que lhe conferem alguma tolerância à seca, são a acumulação de osmólitos no citoplasma, nomeadamente prolina e açúcares, como o manitol, que lhe permite regular a pressão osmótica, e ainda o aumento das ceras epicuticulares nas folhas, o que diminui a perda de água, aumentando a tolerância da espécie à seca (Ahmed *et al.*, 2009; Bacelar *et al.*, 2006; Ennajeh *et al.*, 2009; Gómez-González *et al.*, 2010).

4.2. Calor

Em Portugal, as temperaturas, tanto as máximas como as mínimas, têm vindo a aumentar nas últimas décadas e tendencialmente continuarão a aumentar, observando-se maiores variações sobretudo nos meses de Verão (Ramos *et al.*, 2011). No século XXI, espera-se um aumento mais acentuado nas temperaturas médias entre os anos 2070 e 2100 (Ramos *et al.*, 2011).

Os estudos com satélites sugerem que estes aumentos de temperatura têm influenciado a altura de folhagem das florestas, verificando-se uma antecipação na data associada a um aumento da temperatura (Galán *et al.*, 2005). Também no caso da oliveira se verifica uma antecipação na floração e na libertação de pólen (Galán *et al.*, 2005). Estes não são os únicos parâmetros influenciados pela temperatura, é sabido que as atividades

fotossintética e metabólica das oliveiras são máximas num intervalo de temperaturas entre os 15 e os 30 °C (Aguilera *et al.*, 2014). Temperaturas elevadas aumentam o conteúdo de pigmentos (clorofilas a e b), provocam danos nas membranas e aumentam a atividade das enzimas antioxidantes nas folhas de oliveira (Koubouris *et al.*, 2015).

Os metabolitos presentes nas folhas de oliveira também sofrem alterações com o aumento da temperatura. A presença de ácidos gordos é modificada, diminuindo o conteúdo em ácidos gordos insaturados, sobretudo no ácido oleico, em oposição, a quantidade de ácido palmítico e esteárico aumenta (Nejad e Niroomand, 2007).

4.3. Radiação UV

A radiação UV é uma radiação cujo comprimento de onda varia entre 100 e 400 nm. À radiação UV são atribuídos alguns efeitos nefastos, nomeadamente a nível da saúde humana, no entanto pode ter também efeitos benéficos, como a produção de vitamina D. A radiação UV que atinge a superfície da terra está relacionada com a camada de ozono, sobretudo no que diz respeito ao UVB (UNEP Environmental Effects Panel, 2010). Nas últimas décadas do século XX houve um aumento nos danos provocados na camada de ozono o que levou ao aumento dos níveis de UVB. Atualmente, a camada de ozono tem vindo a recuperar, no entanto, os níveis de UVB poderão manter-se elevados devido a outros fatores como nuvens, aerossóis e reflexão na terra.

Apesar da radiação UVB ser necessária para as plantas (por exemplo para o controlo da expressão de alguns genes, nas atividades celulares e metabólicas ou no crescimento e desenvolvimento da planta), em excesso esta radiação afeta diversas características das plantas tanto físicas como bioquímicas. A incidência de radiação UVB conduz ao aumento do *stress* oxidativo, sobretudo no que diz respeito à peroxidação lipídica (Koubouris *et al.*, 2015). O aumento da concentração de minerais (Na^+ , Cl^- , K^+ e Ca^{2+}), açúcares/poliois (manitol), pigmentos (xantofilas) e da atividade de enzimas antioxidantes foi verificado em folhas de oliveira após exposição a quantidades elevadas de radiação UVB (Koubouris *et al.*, 2015; Remorini *et al.*, 2009). Outra resposta típica da oliveira quando exposta a quantidades elevadas de radiação UVB é a diminuição das

proteínas presentes nas folhas e também a alteração no metabolismo dos compostos fenólicos. Os flavonoides e os secoiridoides são os compostos fenólicos que mais aumentam devido à radiação UV, verificando-se maior alteração no metabolismo dos glucósidos de luteolina e algumas alterações no metabolismo do hidroxitirosol, no entanto, no que diz respeito aos glucósidos de apigenina, não se verificam diferenças (Liakopoulos *et al.*, 2006; Liakoura *et al.*, 1999; Remorini *et al.*, 2009). Em geral estas alterações metabólicas induzidas pela radiação UVB têm como propósito o combate a espécies reativas de oxigênio e controlo dos danos oxidativos (Koubouris *et al.*, 2015; Remorini *et al.*, 2009).

5. Extração, identificação e quantificação de compostos presentes em folhas de plantas

5.1. Métodos de extração

Os extratos das folhas de plantas podem ser obtidos a partir de diferentes métodos, os quais irão influenciar a composição final do extrato. A extração sólido-líquido convencional é um método simples que consiste na maceração da amostra na presença de um solvente líquido, estando a composição do extrato obtido relacionada com a amostra e o solvente utilizado (Rodríguez-Bernaldo de Quirós *et al.*, 2010; Şahin *et al.*, 2011). O rendimento deste tipo de extração varia consoante a concentração e volume do solvente e a agitação que é aplicada (Rodríguez-Bernaldo de Quirós *et al.*, 2010). Também a temperatura tem influência no rendimento obtido. Um processo de extração a quente comumente utilizado é o método de soxhlet. O aumento do tempo e da temperatura de extração promovem melhores rendimentos, no entanto, também têm um impacto negativo na degradação de alguns compostos fenólicos (Rodríguez-Bernaldo de Quirós *et al.*, 2010).

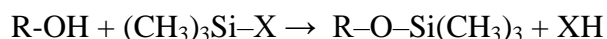
O hexano, o metanol e o etanol são exemplos de solventes utilizados. Sendo o hexano um solvente apolar dissolve preferencialmente compostos apolares já o metanol e o etanol dissolvem preferencialmente compostos polares (Şahin *et al.*, 2011).

5.2. Métodos de identificação e quantificação de compostos presentes no extrato de folhas

A identificação de compostos pode ser realizada recorrendo, por exemplo, a técnicas de cromatografia, gasosa e líquida, acopladas a espectrometria de massa, respetivamente GC-MS e LC-MS.

A cromatografia é um método de separação física em que os componentes são distribuídos por duas fases imiscíveis, a fase estacionária e a fase móvel, e são separados de acordo com a retenção no sistema (Ahuja, 2003). Os analitos voláteis presentes em solução são separados por cromatografia gasosa, já a cromatografia líquida é usada para separar os analitos polares, pouco voláteis ou termolábeis (Ahuja, 2003). Assim para a análise dos extratos de hexano pode ser usada a GC-MS, já a análise dos extratos de metanol e etanol pode ser feita com recurso à LC-MS.

A volatilidade de alguns compostos pode ser aumentada através de reações de sililação, o que permite obter melhores resultados. A sililação consiste na substituição do hidrogénio dos grupos OH, SH ou NH pelo grupo sililo, como demonstrado na equação abaixo (Blau e Halket, 1993). Geralmente, os reagentes de sililação usados são derivados do trimetilsililo.



A cromatografia separa os componentes presentes em solução com base nos seus tempos de retenção sendo posteriormente detetados e identificados através da espectrometria de massa, permitindo obter o espectro de massa de cada produto isolado (Ahuja, 2003). No espectrómetro de massa, os analitos são ionizados e separados por interação com campos elétricos de acordo com a razão massa/carga (m/z) do ião formado e é feito o registo de iões para cada m/z (Ahuja, 2003). Todo o processo é controlado por computador. No final, obtém-se um cromatograma cujos picos relacionam a abundância com o valor m/z de cada componente da amostra (Ahuja, 2003). A partir da área de cada pico do cromatograma é possível quantificar cada componente (Ahuja, 2003).

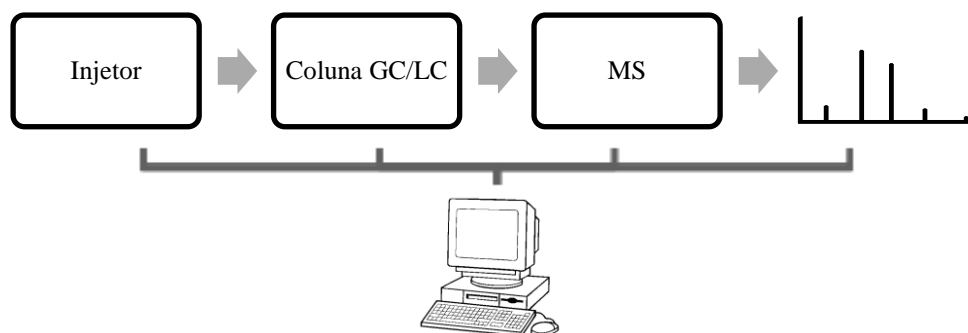


Figura 13. Esquema de GC-MS e LC-MS

5.3. Extração e quantificação de metabolitos de folhas de oliveira

Os estudos realizados em folhas de oliveira focam principalmente os compostos fenólicos (Brahmi *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2010; Guinda *et al.*, 2015; Meirinhos *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007). Em alguns desses trabalhos, a extração foi realizada a frio com metanol (Brahmi *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2010) ou com uma mistura de metanol e etanol (Romero *et al.*, 2016) e os compostos fenólicos extraídos foram analisados por cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) (Brahmi *et al.*, 2014), ou HPLC acoplada a espectrometria de massa com ionização por *electrospray* e TOF (ESI-TOF-MS) (Fu *et al.*, 2010), enquanto os ácidos triterpénicos foram analisados por LC com detetor de foto-díodos (DAD) (Olmo-García *et al.*, 2016). Pereira *et al.* (2007) extraiu os compostos fenólicos a quente com água enquanto Meirinhos *et al.* (2005) utilizou metanol também a quente (45°C). A análise dos extratos foi realizada por HPLC-DAD-MS (Meirinhos *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007). No trabalho realizado por Guinda *et al.* (2015), os compostos fenólicos, açúcares e polióis foram extraídos das folhas de oliveira também a frio com etanol e analisados por HPLC. A fração de triterpenoides foi também extraída com o mesmo método mas analisada por GC-MS (Guinda *et al.*, 2015). Também há trabalhos publicados descrevendo a extração de ácidos gordos das folhas de oliveira, com hexano a frio e posteriormente analisados por GC com detetor por ionização de chama (GC-FID) (Cavalheiro *et al.*, 2015). Orozco-Solano *et al.* (2010b) realizou a extração dos metabolitos, esteróis, ácidos gordos e álcoois, com uma mistura de diclorometano e hexano a 20°C e posteriormente analisou-os por GC-MS.

6. Avaliação do poder antioxidante de extratos de folhas de plantas

Um método bastante utilizado para avaliar o poder antioxidante de extratos vegetais é o método de DPPH. Trata-se de um método *in vitro* que consiste na reação entre um composto antioxidante e o radical estável 2,2-difenil-picril-hidrazilo (DPPH \cdot), numa solução de metanol, tal como se encontra representado na Figura 14 (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998). O radical DPPH \cdot tem uma absorvência característica a 515 nm, que diminui quando o DPPH \cdot é reduzido por um antioxidante (AH) ou por outro radical (R \cdot) (Brand-Williams *et al.*, 1995). A redução do DPPH \cdot permite determinar o poder antioxidante de determinado composto, que é tanto maior quanto menor for a absorvência após a reação.

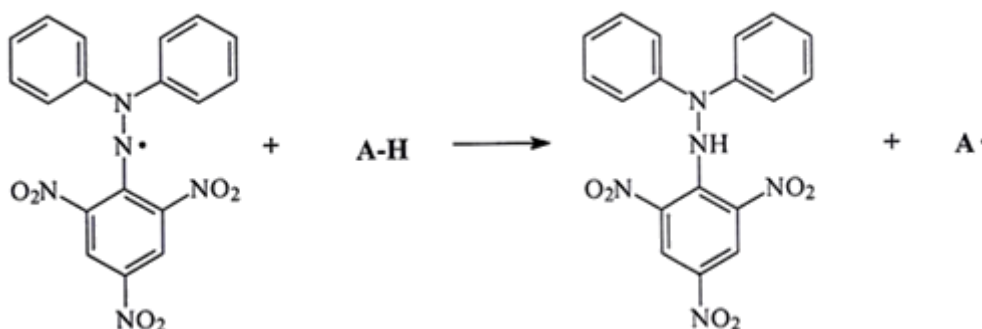


Figura 14. Reação entre o radical DPPH \cdot e o composto antioxidante

Vários autores como Allouche *et al.* (2011), Bouaziz *et al.* (2008) Brahmi *et al.*, (2014), Kiritsakis *et al.* (2010) e Marcos *et al.* (2014) estudaram a atividade antioxidante de extratos de folhas de oliveira através do método de DPPH \cdot . No entanto existem estudos onde foram utilizados outros métodos como o método de ABTS - 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) utilizado por Allouche *et al.* (2011), Brahmi *et al.* (2014) Jemai *et al.* (2008) ou os métodos de FRAP - poder antioxidante por redução do ião férrico e do ORAC - capacidade de absorção do radical oxigénio ambos usados no estudo realizado por Hayes *et al.* (2011).

OBJETIVO

A oliveira é uma das principais culturas na região mediterrânea, valorizada sobretudo pelo azeite extraído do seu fruto. Para além da azeitona, também as suas folhas são muito valorizadas pois apresentam uma composição interessante rica em compostos com benefícios biológicos, como é o caso dos compostos fenólicos, ácidos gordos e terpenos. No entanto, as alterações ambientais que se têm vindo a verificar levam a que as plantas sofram adaptações conduzindo a alterações fisiológicas e bioquímicas. Apesar da oliveira ser uma planta bastante tolerante à seca, alguns estudos indicam que a ação conjunta de vários *stresses* pode afetar o metabolismo desta espécie e consequentemente a composição e conteúdo de metabolitos das folhas e dos frutos.

Assim, neste contexto, os objetivos deste trabalho consistem e continuarão a consistir em:

- Determinar os efeitos provocados por diferentes *stresses* abióticos, seca, calor e radiação excessiva de UVB (aplicados separadamente e em conjunto) no perfil lipofílico (GC-MS) e fenólico (LC-MS) de folhas de oliveira;
- Avaliar o perfil desses metabolitos presentes nas folhas das mesmas oliveiras após um período de recuperação dos *stresses* aplicados;
- Verificar a atividade antioxidante (AA) de cada extrato obtido para cada tratamento.

Para tal, os metabolitos presentes nas folhas de plantas jovens de *O. europaea* (variedade Cobrançosa) previamente submetidas a seca, calor e radiação UVB, separadamente e em conjunto, foram extraídos com hexano, metanol e etanol e analisados por GC-MS (extrato de hexano) e LC-MS (extrato de metanol e etanol).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras de folhas oliveira

Oliveiras (*Olea europaea* L.) da variedade Cobrançosa com um ano, provenientes dos Viveiros Vítor Costa (Mealhada, Portugal), foram transferidas para uma câmara climática com 23 ± 2 °C de temperatura, 40% de humidade e 16/8 h de fotoperíodo de luz, proveniente de lâmpadas fluorescentes (Osram) com a intensidade de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 15 dias nestas condições, as plantas foram bem regadas (até 100% da capacidade do campo) com uma solução nutritiva (Complezal 12-4-6, Bayer). Posteriormente, foram seleccionadas plantas com altura semelhante ($73 \pm 4,2$ cm) e separadas em cinco grupos:

Grupo 1: Grupo de controlo (C, n = 20) – as plantas bem irrigadas;

Grupo 2: Grupo de seca (S, n = 20) – as plantas não foram regadas durante 30 dias;

Grupo 3: Grupo de choque térmico (CT, n = 16) – as plantas foram bem regadas e expostas a 40 ± 2 °C por 2 h, durante 2 dias consecutivos;

Grupo 4: Grupo de radiação UVB elevada (UVB, n = 20) – as plantas foram bem regadas e expostas a $12 \text{Kj m}^{-2}\text{d}^{-1}$, durante 2 dias consecutivos;

Grupo 5: Grupo de *stresses* combinados (S + CT + UVB, n = 16) – as plantas foram sujeitas a *stress* hídrico (seca - S) por 30 dias, expostas a 40 ± 2 °C por 2 h (CT) e a $12 \text{Kj m}^{-2}\text{d}^{-1}$ (UVB), durante os 2 últimos dias de *stress* hídrico.

No final dos tratamentos de *stress*, foram colhidas folhas das plantas de cada grupo, lavadas em água destilada (3 vezes) e secas na estufa durante 10 dias. Depois de secas, as folhas foram trituradas num moinho de café. Para o tratamento C obteve-se 28,19 g de material seco, para o tratamento S obteve-se 40,42 g, para o tratamento CT obteve-se 46,31 g, para o tratamento UVB obteve-se 31,52 g e para o tratamento S + CT + UVB obteve-se 42,20 g.

Após os tratamentos *de stress*, metade das plantas de cada grupo foi usada para avaliar a sua capacidade de recuperação (C_R - plantas do grupo 1 após período de recuperação, S_R – plantas do grupo 2 após período de recuperação, CT_R – plantas do grupo 3 após período de recuperação, UVB_R – plantas do grupo 4 após período de recuperação, S

+ CT + UVB_R - plantas do grupo 5 após período de recuperação). As plantas foram novamente colocadas em condições ótimas de crescimento (23 ± 2 °C de temperatura, 40% de humidade e 16/8 h de fotoperíodo de luz) e regadas até 100% da capacidade do campo. Após 30 dias em recuperação, foram de novo colhidas amostras que foram tratadas do mesmo modo descrito acima. Na recuperação, depois de secas as folhas foram também trituradas e obteve-se 34,85 g de material para o tratamento C_R, 28,84 g para o tratamento S_R, 32,33 g para o tratamento CT_R, 32,68 g para o tratamento UVB_R e 26,84 g para o tratamento S + CT + UVB_R.

2. Extração de metabolitos das folhas de oliveira

As extrações dos metabolitos presentes nas folhas de oliveira em condições de controlo e submetidas aos tratamentos de *stress* foram realizadas com solventes de polaridade crescente – n-hexano, metanol e, por fim, etanol. As amostras pulverizadas foram pesadas e foi-lhes adicionado por cada grama de amostra 10 mL de n-hexano, num sistema fechado, com agitação e à temperatura ambiente, tendo sido realizados 2 ciclos de extração de 72 h. Após cada ciclo de extração, o extrato foi filtrado e o solvente evaporado num evaporador rotativo e, depois de se encontrar bem seco, o resíduo total obtido foi pesado. O mesmo processo foi realizado utilizando o metanol como solvente. Posteriormente procedeu-se à extração a quente utilizando o Soxhlet, onde foram utilizados 600 mL de etanol, tendo sido realizados 3 ciclos de extração de 72 h, após os quais o solvente foi evaporado e o resíduo pesado.

O mesmo procedimento foi realizado com as folhas de oliveira obtidas após a recuperação, no entanto a extração com metanol não foi realizada, uma vez que se verificou ser desnecessária. Pois, quando analisados e comparados os cromatogramas obtidos da análise dos dois extratos (de metanol e de etanol), os metabolitos identificados no metanol coincidiram com os do etanol, sendo que se extraiu uma maior quantidade de metabolitos com o etanol do que com o metanol.

3. Análise de metabolitos presentes nos extratos de folhas de oliveira

3.1. Análise do perfil lipofílico

3.1.1. Análise qualitativa: GC-MS

Os metabolitos presentes nos extratos de n-hexano foram identificados por análise GC-MS. Primeiramente, os extratos secos foram dissolvidos em diclorometano, obtendo-se soluções de concentração conhecida (entre 50 e 150 mg/mL). Foram realizadas reações de sililação nas quais foram utilizados tubos de sililação com um volume de solução correspondente a 18 mg de extrato, 250 µL de padrão interno (tetracosano 1,2 mmol/L), 250 µL de piridina, 250 µL de *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 µL de trimetilsilil cloro (TMSCl). A reação decorreu durante uma hora a 70 °C, tendo sido realizadas quatro réplicas de cada amostra.

A análise cromatográfica dos extratos sililados foi realizada usando GC-MS QP2010 Ultra Shimadzu equipado com uma coluna capilar DB-5-J&W (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura do filme). A fase móvel utilizada foi hélio, com um fluxo de 1,13 mL/min e a amostra foi injetada no modo *split* numa razão de 1:50. A temperatura inicial da coluna foi mantida a 70 °C por 5 min, depois foi aumentada, primeiro 4 °C/min até aos 250 °C, e posteriormente 2 °C/min até aos 300 °C, onde se manteve por 5 min. A temperatura do injetor foi de 320 °C e a da linha de transferência foi de 200 °C. A ionização foi realizada por impacto eletrónico, com 70 eV de energia. A recolha dos dados foi feita numa taxa de 1 scan/s numa gr de m/z 50 – 1000. A análise de GC-MS decorreu durante 87 min.

A identificação dos compostos presentes nos extratos de n-hexano foi feita através da comparação direta com uma base de dados de espectroscopia de massa (NIST14 Mass spectral e WILEY RegistryTM of Mass Spectra Data).

3.1.2. Análise quantitativa

Foram preparadas soluções com padrões representativos de cada família de compostos presentes nas amostras: ácido palmítico (0,57 mg/mL) para os ácidos

carboxílicos e amidas, octadecanol (2,02 mg/mL) para álcoois, colesterol (2,00 mg/mL) para esteróis e terpenos e octadecano (2,38 mg/mL) para alcanos, a partir das quais se fizeram várias diluições, e maltose para carboidratos, onde se prepararam várias soluções com diferentes concentrações (tabela 9 do anexo 1). Os padrões sililados foram injetados no GC-MS sob as mesmas condições que os extratos e foram construídas curvas de calibração com um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,98, para cada padrão. As referidas retas de calibração encontram-se no anexo 1.

3.2. Análise do perfil fenólico

3.2.1. Análise qualitativa: LC-MS

Os metabolitos presentes nos extratos de metanol e de etanol foram analisados através de UHPLC-MS (Ultra-Alta Performance LC-MS). Primeiramente, os extratos secos foram dissolvidos em metanol, obtendo-se soluções de concentração conhecida (10 mg/mL). As amostras foram filtradas através de uma membrana de 0,2 µm de Nylon (Whatman). Para cada amostra foram realizadas quatro réplicas.

A análise cromatográfica dos extratos foi realizada usando um Thermo Scientific Ultimate 3000RSLC (Dionex) equipado com um detetor de matriz de diodo DionexUltiMate 3000 RS acoplado a um espectrómetro de massa. A coluna utilizada foi a “*thermo scientific hypersil gold*” (1000 mm x 20 mm) com 1,9 µm, tendo-se mantido a sua temperatura a 30 °C. A fase móvel utilizada foi acetonitrilo (solvente A) e ácido fórmico 0,1% (v/v) (solvente B) previamente desgaseificados e filtrados, com um fluxo de 0,2 mL/min. O gradiente de solvente foi iniciado com 5% de solvente B por 14 min, de seguida, 40% de solvente B durante 2 min, posteriormente, 100% por mais de 7 min e, por fim, 5% por mais de 10 min. Foram injetados 2 µL de amostra. Obtiveram-se dados espectrais UV-vis na gama de 250 a 500 nm e os perfis cromatográficos foram registados a 280 nm. Foi utilizado um espectrómetro de massa LTQ XL “*linear ion trap 2D*” com uma fonte de ionização de *eletrospray* ortogonal (ESI) de temperatura capilar de 275 °C. A ionização foi realizada por uma fonte de *eletrospray* de 5,00 kV, tendo sido utilizado no modo de ião negativo. A recolha dos dados foi feita numa gama de m/z 50,00 – 2000,00. Foram também obtidos, em simultâneo dissociações de iões precursores induzidas por colisão MS/MS e MSⁿ.

3.2.2. Análise quantitativa

Foram preparadas soluções com padrões representativos de cada família de compostos presentes nas amostras: derivados do ácido hidroxicinâmico e secoiridoides (ácido cafeico), flavonoides (quercetina), ácidos carboxílicos (ácido ursólico). Os padrões foram injetados no LC-MS sob as mesmas condições que os extratos e foram construídas curvas de calibração com um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,98, para cada padrão. As referidas retas encontram-se no anexo 2.

4. Avaliação do poder antioxidante de extratos de folhas de plantas

Foi preparada uma solução de DPPH com uma absorvência entre 0,7 e 0,8, a 517 nm e a 20 °C, a qual foi utilizada para determinar a atividade antioxidante dos extratos fenólicos das folhas de oliveira de cada tratamento. Para tal, 40 µL de uma solução de cada amostra com concentração 10 mg/mL reagiu com 800 µL da solução de DPPH durante 30 minutos, na ausência de luz. Após este intervalo foram medidas as absorvências de cada amostra a 517 nm e a 20 °C (Pérez-Tortosa *et al.*, 2012).

Para a reta de calibração foi usada uma solução de quercetina preparada em metanol de concentração 8,6 mg/mL. Do mesmo modo que se procedeu para as amostras, foram preparadas, a partir da solução mãe de quercetina, soluções com diferentes concentrações cujas absorvências foram medidas a 517 nm, a 20 °C, 30 minutos após início da reação com o DPPH. Com base nos resultados obtidos foi construída a reta de calibração. A referida reta encontra-se no anexo 3.

5. Análise estatística

A análise estatística dos dados consistiu na análise de variâncias (One-way ANOVA) seguida do teste de Holm-Sidak (teste de comparação múltipla), usando o *software* Sigma Stat para Windows (versão 3.1). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

RESULTADOS

1. Composição lipofílica dos extratos de folhas de oliveiras após tratamento de stress

Na figura 15 encontra-se um cromatograma, obtido por GC-MS, do perfil lipofílico dos extratos de folhas de oliveira, estando na tabela 1 a identificação e composição lipofílica do extrato correspondente a cada tratamento - controlo (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e *stresses* combinados (S + CT + UVB). Foram identificados 26 compostos distintos divididos por cinco famílias: açúcares e polióis, ácidos gordos, terpenos, alcanos e esteróis. Foi também detetado triptofano (pico f, Figura 15) em quantidades vestigiais e não quantificáveis. Este aminoácido foi identificado em todas as amostras com exceção do tratamento UVB.

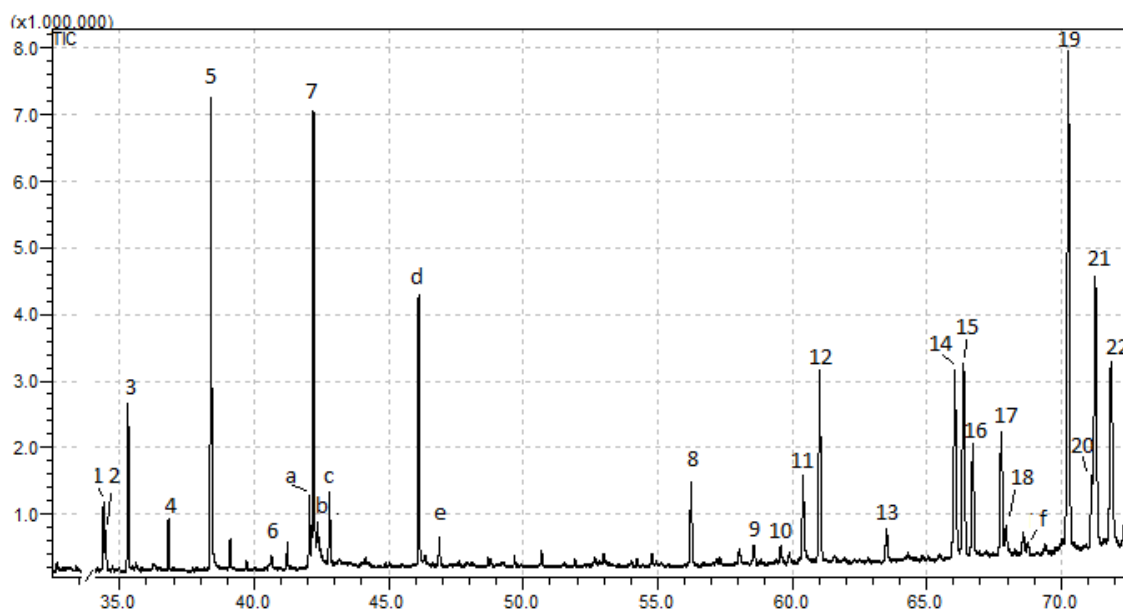


Figura 15.Exemplo de um dos cromatogramas obtidos por GC-MS dos extratos de hexano, no qual os picos identificados com números de 1 a 22 correspondem aos compostos identificados na tabela 1 e 4 e as letras (a a f) identificam os picos correspondentes ao ácido linoeláidico (pico a), ácido linolénico (pico b), ácido esteárico (pico c), padrão interno (pico d), ácido eicosanóico (pico e) e triptofano (pico f).

Tabela 1. Composição lipofílica dos extratos de folhas de oliveira (g/Kg PS) de cada tratamento - controle (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e *stresses* combinados (S + CT + UVB). Os valores representam média \pm desvio padrão ($n = 3 - 4$). Em cada linha, letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos.

Pico	Composto	C	S	CT	UVB	S + CT + UVB
Alcanos						
8	Alcano 1	0,354 \pm 0,084 ^{ab}	0,287 \pm 0,013 ^{ab}	0,256 \pm 0,020 ^b	0,362 \pm 0,013 ^a	0,277 \pm 0,007 ^{ab}
10	Alcano 2	0,509 \pm 0,062 ^a	0,377 \pm 0,044 ^b	0,352 \pm 0,073 ^b	0,441 \pm 0,065 ^{ab}	0,340 \pm 0,029 ^b
12	Alcano 3	0,379 \pm 0,011 ^a	0,268 \pm 0,008 ^c	0,240 \pm 0,016 ^d	0,336 \pm 0,013 ^b	0,252 \pm 0,007 ^{cd}
13	Alcano 4	0,544 \pm 0,080 ^a	0,395 \pm 0,058 ^{ab}	0,383 \pm 0,098 ^{ab}	0,446 \pm 0,076 ^{ab}	0,369 \pm 0,034 ^b
14	Alcano 5	0,374 \pm 0,009 ^a	0,261 \pm 0,007 ^b	0,233 \pm 0,012 ^c	ND	0,248 \pm 0,005 ^{bc}
20	Alcano 6	0,429 \pm 0,013 ^a	0,293 \pm 0,023 ^b	0,274 \pm 0,040 ^b	ND	0,274 \pm 0,014 ^b
Total		2,589	1,880	1,739	1,585	1,760
Ácidos gordos						
5	Ácido Palmítico	0,669 \pm 0,057 ^{ab}	0,580 \pm 0,087 ^{ab}	0,474 \pm 0,054 ^b	0,669 \pm 0,039 ^{ab}	0,795 \pm 0,037 ^a
7	Ácido Oleico	0,660 \pm 0,054 ^{ab}	0,563 \pm 0,080 ^{ab}	0,486 \pm 0,050 ^b	0,689 \pm 0,043 ^{ab}	0,840 \pm 0,069 ^a
Total		1,329	1,144	0,961	1,358	1,636
Terpenos						
9	Timol- β -D-glucopiranosídeo	0,037 \pm 0,005 ^a	0,058 \pm 0,017 ^a	0,024 \pm 0,008 ^a	0,050 \pm 0,036 ^a	0,031 \pm 0,014 ^a
16	β -Amirina	0,134 \pm 0,022 ^a	0,115 \pm 0,022 ^a	0,094 \pm 0,012 ^a	0,142 \pm 0,017 ^a	0,120 \pm 0,023 ^a
17	α -Amirina	0,141 \pm 0,024 ^a	0,125 \pm 0,025 ^a	0,102 \pm 0,017 ^a	0,146 \pm 0,014 ^a	0,130 \pm 0,024 ^a
18	Lup-20(29)-en-3-al	0,233 \pm 0,062 ^a	0,228 \pm 0,062 ^a	0,171 \pm 0,038 ^a	0,270 \pm 0,014 ^a	0,271 \pm 0,077 ^a
19	Lupeol	0,243 \pm 0,074 ^a	0,237 \pm 0,074 ^a	0,144 \pm 0,038 ^a	0,266 \pm 0,051 ^a	0,253 \pm 0,074 ^a
21	Aldeído Ursólico	0,088 \pm 0,006 ^a	0,067 \pm 0,006 ^b	0,054 \pm 0,004 ^b	0,091 \pm 0,001 ^a	0,067 \pm 0,007 ^b
22	Ácido Ursólico	0,087 \pm 0,008 ^a	0,066 \pm 0,008 ^{bc}	0,054 \pm 0,007 ^c	0,082 \pm 0,006 ^{ab}	0,069 \pm 0,010 ^{bc}
Total		0,962	0,896	0,644	1,047	0,940

Pico	Composto	C	S	CT	UVB	S + CT + UVB
Esteróis						
11	Estigmast-5-en-3-ol	0,109 ± 0,011 ^a	0,088 ± 0,014 ^a	0,073 ± 0,010 ^a	0,102 ± 0,010 ^a	0,106 ± 0,022 ^a
15	β-Sitosterol	0,186 ± 0,036 ^a	0,173 ± 0,040 ^a	0,140 ± 0,023 ^a	0,205 ± 0,023 ^a	0,204 ± 0,042 ^a
Total		0,294	0,261	0,213	0,307	0,310
Açúcares e Polióis						
1	Gluconolactona	0,060 ± 0,003 ^a	0,038 ± 0,018 ^a	0,060 ± 0,003 ^a	0,040 ± 0,004 ^a	0,061 ± 0,021 ^a
2	D-Glucose	0,038 ± 0,009 ^a	0,029 ± 0,012 ^a	0,038 ± 0,009 ^a	0,025 ± 0,001 ^a	0,021 ± 0,001 ^a
3	D-Sorbitol/ D-Manitol	0,070 ± 0,018 ^a	0,116 ± 0,050 ^a	0,070 ± 0,018 ^a	0,053 ± 0,011 ^a	0,093 ± 0,024 ^a
4	D-(+)-Galactopirranose	0,041 ± 0,011 ^a	0,039 ± 0,010 ^a	0,041 ± 0,011 ^a	0,026 ± 0,002 ^a	0,024 ± 0,005 ^a
6	D-(+)-Turanose	0,017 ± 0,000 ^a	0,022 ± 0,005 ^a	0,025 ± 0,006 ^a	0,027 ± 0,007 ^a	0,021 ± 0,003 ^a
Total		0,234	0,244	0,192	0,172	0,220

ND – não detetado

Na figura 16, encontra-se graficamente representado o total de açúcares e polióis, ácidos gordos, terpenos, alcanos e esteróis presentes nas folhas de oliveira para cada tratamento. Da análise da tabela 1 e da figura 16, verifica-se que os compostos presentes em maior quantidade nas folhas de oliveira de todos os tratamentos são os alcanos, seguindo-se os ácidos gordos e os terpenos e, por fim, em menor quantidade encontram-se os esteróis e os açúcares.

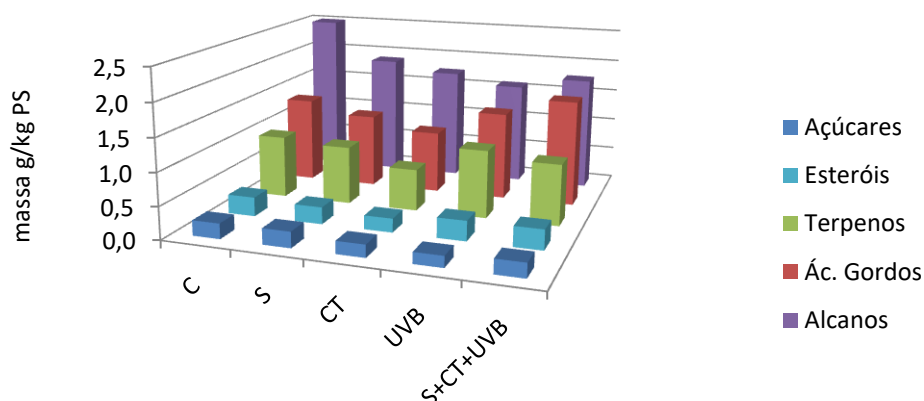


Figura 16. Representação gráfica do total de açúcares, esteróis, triterpenos, ácidos gordos e alcanos (g/Kg PS) presentes nas folhas de oliveira de cada tratamento – controlo (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e *stresses* combinados (S + CT + UVB).

Da análise da tabela 1 e da figura 16, verifica-se que os alcanos são os compostos maioritariamente presentes nas folhas. É no tratamento de controlo que estes compostos se encontram em maior percentagem (27%), diminuindo nas folhas de oliveiras expostas aos diferentes *stresses*, sendo a percentagem mais baixa de alcanos totais presente no grupo UVB (17%) (figura 17). Na tabela 1 é possível observar as diferenças provocadas pelos diferentes tratamentos no que diz respeito a cada alceno identificado (alcanos 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Em comum, todos os tratamentos apresentam maiores quantidades dos alcanos 2 e 4. Os alcanos 5 e 6 não foram encontrados no tratamento UVB.

Os compostos que se sucedem aos alcanos são ácidos gordos, tal como apresentado na figura 16. As folhas de oliveiras expostas a S + CT + UVB apresentaram a maior percentagem de ácidos gordos (25%), seguida do C e tratamento UVB, com 21%, e as menores percentagens foram observadas no tratamento S e CT, respetivamente 18% e 15% (figura 17). Dentro deste grupo de compostos, houve dois ácidos gordos que se destacaram, o ácido palmítico e o ácido oleico, que são os que se encontram presentes em maiores quantidades nas folhas de oliveira. As oliveiras expostas ao tratamento S + CT + UVB produziram maior quantidade destes ácidos ($P < 0,05$) do que as expostas apenas ao tratamento CT (tabela 1). Foram também identificados, em quantidades vestigiais e não quantificáveis, outros ácidos gordos, tais como ácido oxálico, ácido tetradecanóico, ácido linoeláidico (pico a, figura 15), ácido linolénico (pico b, figura 15), ácido esteárico (pico c, figura 15) e ácido eicosanóico (pico e, figura 15).

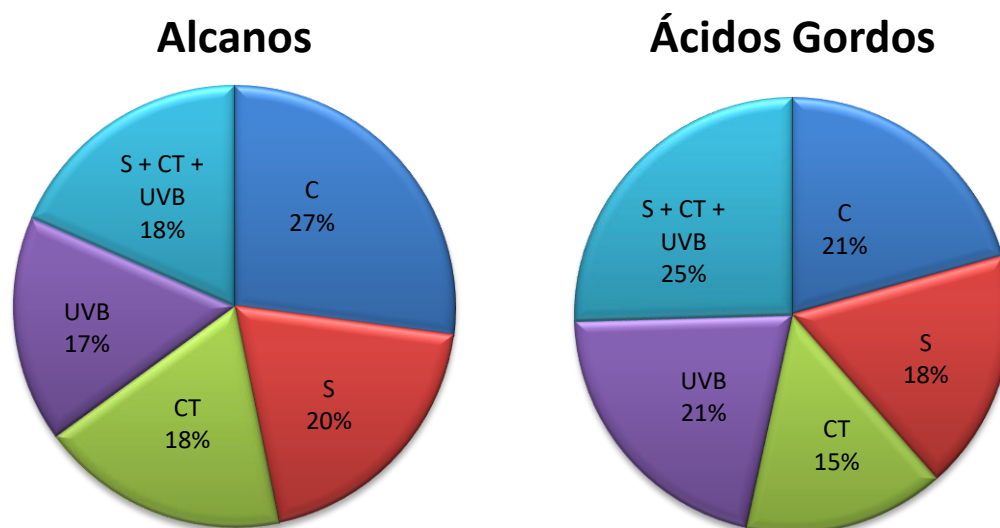


Figura 17. Percentagem de alcanos e ácidos gordos presentes nas folhas de oliveira em cada tratamento – controle (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e *stresses* combinados (S + CT + UVB).

Como se encontra representado tanto na tabela 1 como na figura 16, a terceira família de compostos que se destaca na composição das folhas são os terpenos, entre eles encontra-se um monoterpene, o timol- β -D-glucósido, e seis triterpenos, α - e β -amirina, lup-20(29)-en-3-al, lupeol, aldeído ursólico e ácido ursólico. As folhas de oliveiras do grupo controle e expostas aos tratamentos de UVB, S + CT + UVB e S apresentaram, de um modo geral, uma maior percentagem de terpenos (UVB: 23%; C: 22%; S + CT + UVB: 21% e S: 20%) do que as folhas de oliveiras do tratamento CT (14%) (figura 18). Na tabela 1 verifica-se que em todos os tratamentos o lup-20(29)-en-3-al e o lupeol são os terpenos maioritários, seguidos das α - e β -amirina, depois o aldeído ursólico e o ácido ursólico e, por fim, em menor quantidade o timol- β -D-glucósido. Não existem diferenças estatisticamente significativas ($P \geq 0,05$) entre a quantidade de terpenos presente nos diferentes tratamentos, com exceção do aldeído ursólico e do ácido ursólico (tabela 1). Os grupos C e UVB apresentam quantidades de aldeído ursólico maiores e estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) das apresentadas pelos grupos S, CT, S + CT + UVB. Já o ácido ursólico está em maior quantidade ($P < 0,05$) nas folhas de oliveiras em condições de controle (C), comparado com as dos tratamentos S + CT + UVB, S ou CT. Não se verificaram diferenças significativas entre a quantidade de ácido ursólico nas folhas de oliveiras do controle e do tratamento UVB.

Oestigmast-5-en-3-ol e o β -sitosterol são os únicos elementos, tal como representado na tabela 1 e na figura 16, da penúltima família identificada, os esteróis. As folhas de oliveiras expostas aos *stresses* combinados, S + CT + UVB (23%), UVB (22%) e S (21%) apresentaram as maiores percentagens de esteróis, seguida do controlo (C) (19%) e a menor percentagem (15%) foi identificada no tratamento CT (figura 18). Através da análise da tabela 1, pode-se verificar que o β -sitosterol prevalece em relação ao estigmast-5-en-3-ol em todos os tratamentos e verifica-se também que não existem diferenças significativas ($P \geq 0,05$) entre os diferentes tratamentos tanto na quantidade de estigmast-5-en-3-ol como na de β -sitosterol.

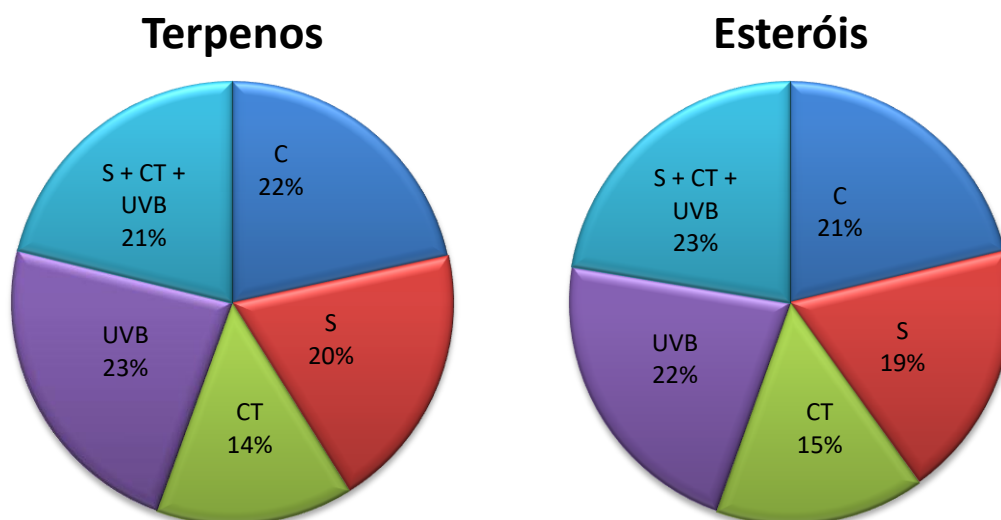


Figura 18. Percentagem de terpenos e esteróis presentes nas folhas de oliveira em cada tratamento – controlo (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e *stresses* combinados (S + CT + UVB).

Por fim, em menor quantidade, foram identificados e quantificados cinco açúcares (gluconolactona, D-glucose, D-sorbitol/D-manitol, galactopirranose e D-(+)-turanose), tal como se encontra na tabela 1 e na figura 16. As folhas de oliveiras expostas ao tratamento S apresentaram a maior percentagem destes açúcares (23%), seguido do controlo e tratamento S + CT + UVB com 22% e 21%, respetivamente (figura 19). Já os tratamentos CT e UVB apresentaram as menores percentagens de açúcares e polióis (16% e 18%, respetivamente) (figura 19). Com recurso à tabela 1, é possível comparar a quantidade dos diferentes açúcares presentes nas folhas de cada tratamento, de modo geral, o D-sorbitol/D-

manitol encontra-se em quantidades mais elevadas. Entre a quantidade de cada açúcar presente nos diferentes tratamentos não foram observadas diferenças estatísticas ($P \geq 0,05$).

Açúcares e polióis

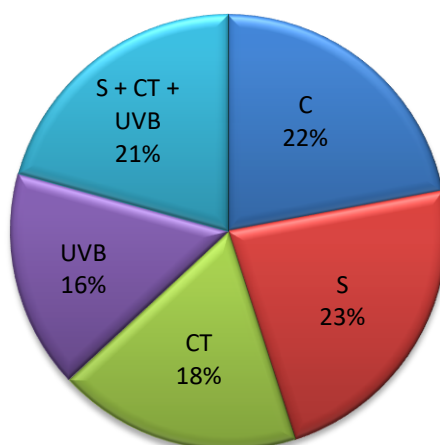


Figura 19. Percentagem de açúcares e polióis presentes nas folhas de oliveira em cada tratamento – controlo (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e *stresses* combinados (S + CT + UVB).

2. Composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos de folhas de oliveiras após tratamento de *stress*

Na figura 20 encontra-se um cromatograma obtido por LC-MS onde foram identificados os compostos pertencentes ao perfil fenólico das folhas de oliveira. Na tabela 2 encontra-se a composição fenólica das folhas de oliveira de cada tratamento – controlo (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e *stresses* combinados (S + CT + UVB) – identificada através de LC-MS, onde a massa (g/Kg de PS) de cada composto corresponde á soma das massas obtidas, para o mesmo composto, nos extratos de metanol e etanol. Foram identificados 22 compostos diferentes pertencentes a quatro grupos: derivados do ácido hidroxicinâmico, ácidos carboxílicos, secoiridoides, e flavonoides. O gráfico 21 permite também comparar a composição total de cada um dos grupos identificados nas folhas de oliveira de cada tratamento.

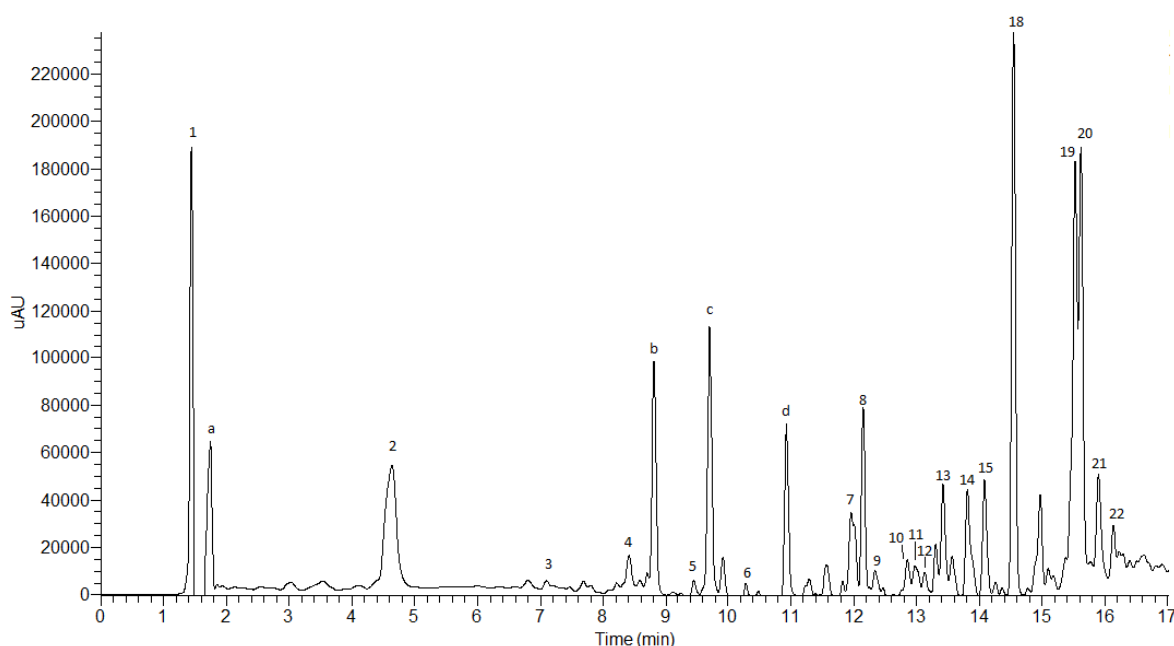


Figura 20. Exemplo de um dos cromatogramas obtidos por LC-MS, dos extratos de etanol de folhas de oliveira após recuperação ao tratamento de *stress*. Os picos assinalados com números de 1 a 22 correspondem aos compostos identificados na tabela 2 e 5 e as letras (a a d) assinalam os picos relevantes cujos compostos não foram identificados.

Tabela 2. Composição fenólica dos extratos de metanol e etanol de folhas de oliveira (g/Kg PS) de cada tratamento - controlo (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e *stresses* combinados (S + CT + UVB). Os valores representam média \pm desvio padrão ($n = 3 - 4$). Em cada linha, letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos.

Pico	Composto	m/z	MS2	C	S	CT	UVB	S + CT + UVB	Referência
Derivados do Ácido Hidroxicinâmico									
10	Verbascósido	623	461	$0,239 \pm 0,0288^{ab}$	$0,165 \pm 0,020^{ab}$	$0,120 \pm 0,005^{ab}$	$0,288 \pm 0,027^a$	$0,020 \pm 0,0003^b$	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Kanakis <i>et al.</i> , 2013; Kontogianni <i>et al.</i> , 2013; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
Ácidos Carboxílicos									
1	Ácido Quínico	191	127; 85; 93	$0,532 \pm 0,137^a$	$0,266 \pm 0,094^b$	$0,567 \pm 0,009^a$	$0,385 \pm 0,026^{ab}$	$0,413 \pm 0,017^{ab}$	(Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a; Spínola <i>et al.</i> , 2014)
4	Ácido Cafeoil-Quínico	353	191	$0,025 \pm 0,002^b$	$0,023 \pm 0,002^b$	$0,022 \pm 0,003^b$	$0,048 \pm 0,004^a$	$0,015 \pm 0,001^c$	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005)
Total				0,557	0,289	0,589	0,433	0,428	
Secoiridoides									
2	Isómero de Oleósido	389	183; 165; 121; 209	$0,084 \pm 0,006^b$	$0,039 \pm 0,002^d$	$0,049 \pm 0,002^c$	$0,098 \pm 0,002^a$	$0,028 \pm 0,001^e$	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Fu <i>et al.</i> , 2010b; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
3	Tirosol	137	137	$0,054 \pm 0,003^a$	$0,017 \pm 0,0003^d$	$0,028 \pm 0,001^b$	$0,021 \pm 0,002^c$	$0,010 \pm 0,001^e$	(Sanz <i>et al.</i> , 2012)
5	Oleósido	389	345; 209; 121; 165	$0,035 \pm 0,004^b$	$0,017 \pm 0,0003^d$	$0,022 \pm 0,001^c$	$0,043 \pm 0,003^a$	$0,006 \pm 0,0001^e$	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Kanakis <i>et al.</i> , 2013; Sanz <i>et al.</i> , 2012)

Pico	Composto	m/z	MS2	C	S	CT	UVB	S + CT + UVB	Referência
6	Derivado da Aglicona de Oleuropeína	377	197; 153	$0,015 \pm 0,001^a$	$0,011 \pm 0,002^b$	$0,015 \pm 0,002^a$	$0,018 \pm 0,002^a$	$0,012 \pm 0,001^{ab}$	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Fu <i>et al.</i> , 2010b)
13	Isómero de Oleuropeína Diglucósido	701	539	$0,083 \pm 0,027^a$	$0,025 \pm 0,004^b$	$0,051 \pm 0,006^{ab}$	$0,086 \pm 0,006^a$	$0,002 \pm 0,001^c$	(Fu <i>et al.</i> , 2010b; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
16	Metiloleuropeína	553	391; 359	$0,199 \pm 0,060^a$	$0,146 \pm 0,003^a$	$0,241 \pm 0,007^a$	$0,190 \pm 0,010^a$	$0,104 \pm 0,016^b$	(Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013b)
17	2"-metoxioleuropeína	569	537; 403; 407	$0,175 \pm 0,012^b$	$0,178 \pm 0,003^b$	$0,161 \pm 0,022^b$	$0,229 \pm 0,010^a$	$0,130 \pm 0,005^c$	(Talhaoui <i>et al.</i> , 2015)
18	Oleuropeína	539	377; 307; 275	$1,255 \pm 0,142^b$	$0,844 \pm 0,013^c$	$0,933 \pm 0,077^c$	$1,648 \pm 0,081^a$	$0,370 \pm 0,016^d$	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Fu <i>et al.</i> , 2010b; Kanakis <i>et al.</i> , 2013; Kontogianni <i>et al.</i> , 2013; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a; Sanz <i>et al.</i> , 2012)
21	Isómero de Lucidumósido C	583	537; 403; 223	$0,152 \pm 0,018^{ab}$	$0,114 \pm 0,011^c$	$0,165 \pm 0,009^a$	$0,111 \pm 0,008^c$	$0,133 \pm 0,006^{bc}$	(Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
22	Ligstrósido	523	361; 291; 259	$0,091 \pm 0,045^a$	$0,034 \pm 0,041^a$	$0,022 \pm 0,015^a$	$0,067 \pm 0,045^a$	ND	(Kontogianni <i>et al.</i> , 2013; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a; Sanz <i>et al.</i> , 2012)
Total				2,143	1,425	1,687	2,511	0,795	
Flavonoides									
7	Rutina	609	301	$0,123 \pm 0,014^a$	$0,079 \pm 0,006^b$	$0,104 \pm 0,010^a$	$0,109 \pm 0,010^a$	$0,026 \pm 0,005^c$	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Fu <i>et al.</i> , 2010b)

Pico	Composto	m/z	MS2	C	S	CT	UVB	S + CT + UVB	Referência
8	Isômero de Rutinósido de Luteolina 1	593	285	0,010 ± 0,002 ^a	0,006 ± 0,001 ^a	0,023 ± 0,028 ^a	0,010 ± 0,008 ^a	0,008 ± 0,004 ^a	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Kanakis <i>et al.</i> , 2013; Kontogianni <i>et al.</i> , 2013)
9	Quercetina -O-hexósido	463	301; 300	0,035 ± 0,010 ^b	0,039 ± 0,002 ^b	0,072 ± 0,012 ^a	0,074 ± 0,002 ^a	0,066 ± 0,001 ^a	(Jaiswal <i>et al.</i> , 2012)
11	Apigenina-7-O-rutinósido	577	269	0,246 ± 0,051 ^a	0,119 ± 0,012 ^{bc}	0,194 ± 0,018 ^{ab}	0,116 ± 0,035 ^c	0,065 ± 0,009 ^c	(Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
12	Quercitina-O-deoxihexósido	447	301; 300	0,023 ± 0,006 ^a	0,003 ± 0,003 ^b	0,016 ± 0,005 ^{ab}	0,011 ± 0,005 ^{ab}	0,005 ± 0,005 ^b	(Spínola <i>et al.</i> , 2014)
14	Isômero de Glucósido de Luteolina	447	285	2,164 ± 0,094 ^a	1,595 ± 0,090 ^b	1,702 ± 0,010 ^b	2,193 ± 0,063 ^a	0,829 ± 0,026 ^c	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Fu <i>et al.</i> , 2010b; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
15	7-O-(Glucopiranosil-D)-crisoeriol	461	299; 446	0,239 ± 0,036 ^a	0,122 ± 0,006 ^b	0,222 ± 0,017 ^a	0,212 ± 0,013 ^a	0,077 ± 0,005 ^b	(Fu <i>et al.</i> , 2010b)
19	Isômero de Rutinósido de Luteolina 2	539	285	0,032 ± 0,009 ^b	0,012 ± 0,002 ^c	0,024 ± 0,009 ^{bc}	0,048 ± 0,005 ^a	ND	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Kanakis <i>et al.</i> , 2013; Kontogianni <i>et al.</i> , 2013)
20	Derivado do Caempferol	583	285	0,371 ± 0,029 ^a	0,171 ± 0,016 ^d	0,218 ± 0,005 ^c	0,251 ± 0,018 ^b	0,082 ± 0,008 ^e	(Spínola <i>et al.</i> , 2014)
Total				3,203	2,123	2,519	3,005	1,132	

ND – não detetado

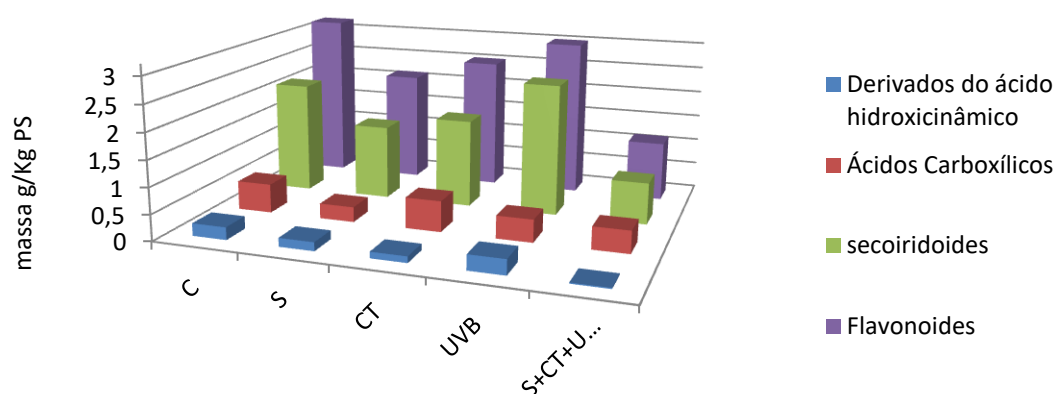


Figura 21. Representação gráfica do total de derivados do ácido hidroxicinâmico, ácidos carboxílicos, secoiridoides, e flavonoides (g/Kg PS) presentes nas folhas de oliveira de cada tratamento – controlo (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e *stresses* combinados (S + CT + UVB).

Da análise da tabela 2 e da figura 21 percebe-se que os compostos identificados por LC-MS são maioritariamente flavonoides e secoiridoides e, em menores quantidades, os ácidos carboxílicos e os derivados do ácido hidroxicinâmico.

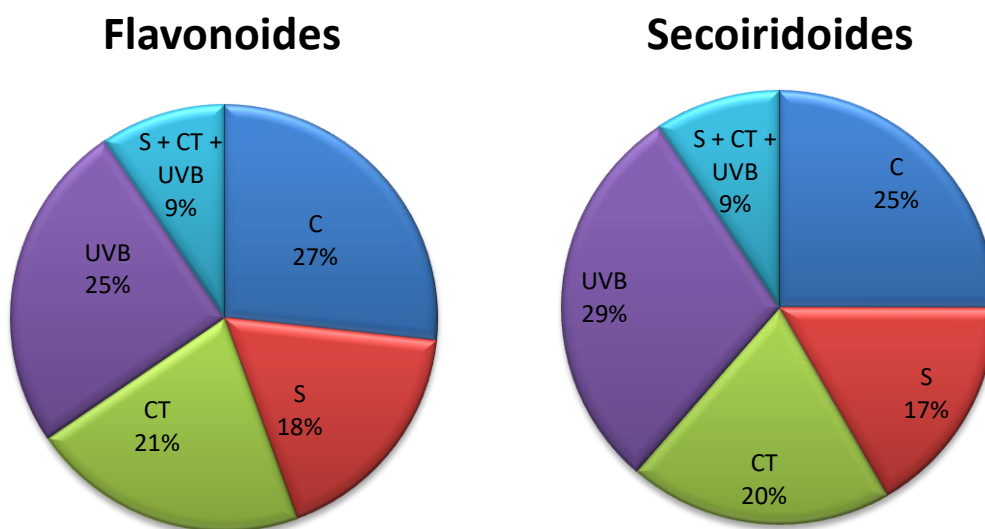


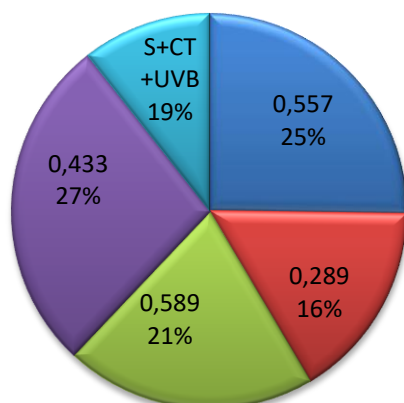
Figura 22. Percentagem de flavonoides e secoiridoides presentes nas folhas de oliveira em cada tratamento – controlo (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e *stresses* combinados (S + CT + UVB).

Entre os grupos referidos os flavonoides são os que se destacam pela sua abundância, como indicam a tabela 2 e a figura 21. Foram identificados 9 compostos pertencentes a este grupo em cada tratamento (tendo sido quantificados apenas 8 no

tratamento *stresses* combinados). A maioria dos flavonoides encontram-se sobretudo nas folhas de oliveiras em condições de C e nos tratamentos UVB e CT (entre 21 a 27% em cada grupo), tal como se verifica na figura 22, já as folhas de oliveira dos tratamentos S e S + CT + UVB têm apenas 18 e 9% dos flavonoides quantificados, respetivamente. Na análise da tabela 2 pode verifica-se que o glucósido de luteolina é o flavonoide que se encontra em maior quantidade em todos os tratamentos correspondendo a mais de metade dos flavonoides encontrados. Verifica-se também que existem diferenças significativas entre os glucósidos de luteolina presentes nos diferentes tratamentos, sendo no controlo e no tratamento UVB que se encontram em maior quantidade ($P \leq 0,05$). Com os tratamentos S e CT, houve uma diminuição significativa nos glucósidos de luteolina em relação ao controlo e UVB, sendo no tratamento S + CT + UVB que estes se encontram em quantidades inferiores ($P \leq 0,05$) (tabela 2).

Como já foi referido, os secoiridoides são também abundantes nas folhas de oliveira em estudo (tabela 2 e figura 21). As folhas de oliveira submetidas ao tratamento UVB apresentaram 29% dos secoiridoides quantificados, seguida do controlo e do grupo CT com 25 e 20%, respetivamente, e, em menor quantidade, estão 9% dos secoiridoides no tratamento S + CT + UVB (figura 22). Entre os 13 secoiridoides identificados destaca-se, largamente, em todos os tratamentos, a oleuropeína. Este composto foi sobretudo produzido nas folhas submetidas ao tratamento UVB ($P \leq 0,05$). Já nos restantes tratamentos as folhas de oliveira apresentam quantidades de oleuropeína inferiores ao grupo controlo ($P \leq 0,05$), entre eles o tratamento com *stresses* combinados é o que levou à maior redução na produção de oleuropeína, não havendo diferenças ($P \geq 0,05$) entre os tratamentos S e CT.

Ácidos carboxílicos



Derivados do ácido Hidroxicinâmico

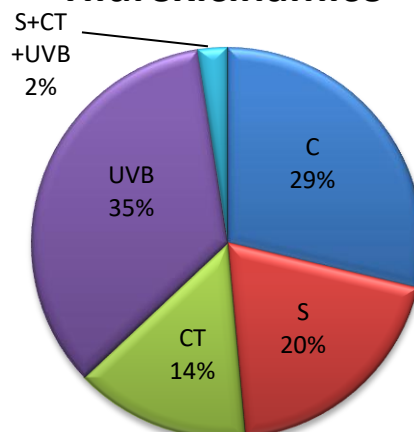


Figura 23. Percentagem de ácidos carboxílicos e derivados do ácido hidroxicinâmico presentes nas folhas de oliveira em cada tratamento – controlo (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e stresses combinados (S + CT + UVB).

Por fim, em quantidades menos significativas encontram-se os ácidos carboxílicos e os derivados do ácido hidroxicinâmico, como se pode comprovar na tabela 2 e figura 21. Os ácidos carboxílicos encontram-se em maior quantidade no tratamento CT (26%), seguido do grupo controlo (24%) e, em menor quantidade no tratamento S (12%). Já os tratamentos UVB e S + CT + UVB contêm igualmente 19% dos ácidos carboxílicos (figura 23). Foram identificados dois ácidos carboxílicos, ácido quínico e ácido cafeoil-quínico, sendo o ácido quínico o mais abundante em todos os tratamentos. Apenas o tratamento S conduziu a uma redução significativa do ácido quínico nas folhas de oliveira relativamente ao grupo controlo. A maior ($P \leq 0,05$) quantidade de ácido cafeoil-quínico foi obtida nas folhas expostas ao tratamento UVB e a menor no tratamento S + CT + UVB. Dos derivados do ácido hidroxicinâmico foi apenas identificado o verbascósido, tal com se encontra na tabela 2. O verbascósido encontra-se em maior quantidade no tratamento UVB (35%) e em menor quantidade no tratamento S + CT + UVB (2%), como indica o gráfico da figura 23. O verbascósido apresenta diferenças ($P \leq 0,05$) apenas entre o tratamento UVB e o tratamento S + CT + UVB (tabela 2).

Os resultados da atividade antioxidante de cada extrato fenólico das folhas de oliveira de cada tratamento encontram-se registados na tabela 3. Da análise da tabela verifica-se que a atividade antioxidante varia entre 0,174 e 0,080, no entanto, os diferentes tratamentos não apresentam diferenças estatísticas entre si ($P \geq 0,05$).

Tabela 3. Atividade antioxidante (mg equiv quercetina mg^{-1}) do perfil fenólico de cada extrato de folhas de oliveira de cada tratamento - controlo (C), seca (S), choque térmico (CT), radiação ultravioleta-B (UVB) e *stresses* combinados (S + CT + UVB). Os valores representam média \pm desvio padrão ($n = 3 - 4$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos.

	C	S	CT	UVB	S + CT + UVB
AA	0,174 \pm 0,046 ^a	0,120 \pm 0,039 ^a	0,129 \pm 0,026 ^a	0,080 \pm 0,024 ^a	0,144 \pm 0,077 ^a

3. Composição lipofílica dos extratos de folhas de oliveiras após um período de recuperação dos tratamentos de *stress*

A composição lipofílica das folhas de oliveira após o período de recuperação dos diferentes tratamentos – C_R, S_R, CT_R, UVB_R e S + CT + UVB_R - encontra-se registada na tabela 4. A identificação e quantificação dos 22 compostos, entre os quais açúcares e polióis, ácidos gordos, terpenos, alcanos e esteróis, foram realizadas com recurso a GC-MS. Nas amostras CT_R, UVB_R e S + CT + UVB_R foi também encontrado, em quantidades não quantificáveis, um aminoácido, o triptofano.

Tabela 4. Composição lipofílica dos extratos de folhas de oliveira (g/Kg PS) após recuperação de cada tratamento - controle (C_R), seca (S_R), choque térmico (CT_R), radiação ultravioleta-B (UVB_R) e *stresses* combinados (S + CT + UVB_R). Os valores representam média ± desvio padrão (*n* = 3 - 4). Em cada linha, letras diferentes indicam diferenças estatísticas (*P* ≤ 0,05) entre os tratamentos.

Pico	Composto	C _R	S _R	CT _R	UVB _R	S + CT + UVB _R
Alcanos						
8	Alcano 1	0,613 ± 0,017 ^a	0,477 ± 0,018 ^b	0,243 ± 0,021 ^c	0,294±0,004 ^d	0,340±0,008 ^c
10	Alcano 2	0,759±0,056 ^a	0,614 ±0,038 ^b	0,354 ±0,032 ^d	0,420±0,010 ^{cd}	0,482 ±0,020 ^c
12	Alcano 3	0,569 ±0,011 ^a	0,443 ±0,008 ^b	0,211 ±0,016 ^c	0,247±0,003 ^d	0,313 ±0,007 ^c
13	Alcano 4	0,743 ±0,054 ^a	0,628±0,048 ^b	0,359 ±0,025 ^c	0,438±0,015 ^d	0,507±0,029 ^c
14	Alcano 5	0,569±0,008 ^a	0,434 ±0,012 ^b	0,196±0,004 ^c	0,238±0,006 ^d	0,307 ±0,007 ^c
20	Alcano 6	0,630±0,017 ^a	0,507 ±0,015 ^b	0,246±0,007 ^c	0,320 ±0,007 ^d	0,355 ±0,004 ^c
Total		3,883	3,103	1,609	1,958	2,304
Ácidos Gordos						
5	Ácido Palmítico	1,240± 0,040 ^a	0,920±0,092 ^{ab}	0,598±0,051 ^b	0,611±0,015 ^b	0,735 ±0,011 ^{ab}
7	Ácido Oleico	1,431 ±0,055 ^a	1,016±0,079 ^b	0,708 ±0,043 ^d	0,761 ±0,037 ^d	0,879±0,013 ^c
Total		2,671	1,936	1,306	1,372	1,614
Terpenos						
9	Timol-β-D-glucopiranosídeo	0,208±0,028 ^a	0,164 ±0,090 ^{ab}	0,027±0,003 ^d	0,043±0,007 ^{cd}	0,078±0,019 ^{bc}
16	β-Amirina	0,189±0,009 ^a	0,160 ±0,012 ^b	0,105±0,007 ^d	0,110±0,007 ^d	0,134 ±0,007 ^c
17	α-Amirina	0,200 ±0,009 ^a	0,168±0,011 ^b	0,112 ±0,009 ^d	0,114±0,008 ^d	0,142 ±0,008 ^c
18	Lup-20(29)-en-3-al	0,396±0,025 ^a	0,382 ±0,033 ^a	0,343 ±0,035 ^a	0,268 ±0,020 ^b	0,379 ±0,024 ^a
19	Lupeol	0,256±0,025 ^a	0,256 ± 0,021 ^a	0,186±0,024 ^{bc}	0,146 ±0,010 ^c	0,215±0,007 ^{ab}
21	Aldeído Ursólico	0,374±0,031 ^a	0,281 ±0,035 ^b	0,147±0,023 ^c	0,169±0,005 ^c	0,192±0,005 ^c
22	Ácido Ursólico	0,139±0,008 ^a	0,115 ±0,012 ^b	0,053±0,004 ^d	0,065 ±0,001 ^d	0,076 ±0,004 ^c
Total		1,762	1,526	0,974	0,914	1,215

Pico	Composto	C _R	S _R	CT _R	UVB _R	S + CT + UVB _R
Esteróis						
11	Estigmast-5-en-3-ol	0,149±0,005 ^a	0,128 ±0,002 ^b	0,065±0,004 ^d	0,072 ±0,002 ^d	0,092 ±0,006 ^c
15	β-Sitosterol	0,271 ±0,024 ^a	0,237±0,030 ^{ab}	0,181±0,013 ^c	0,172 ±0,004 ^c	0,211 ±0,007 ^{bc}
Total		0,420	0,364	0,247	0,243	0,302
Açúcares e Polióis						
1	Gluconolactona	0,260±0,038 ^a	0,279±0,112 ^a	0,044±0,004 ^b	0,059 ±0,002 ^{ab}	0,088 ±0,006 ^{ab}
2	D-Glucose	0,049±0,005 ^a	0,051±0,007 ^a	0,015 ±0,001 ^b	0,038±0,001 ^a	0,045 ±0,001 ^a
3	D-Sorbitol/ D-Manitol	0,548 ±0,014 ^a	0,353±0,035 ^b	0,118 ±0,012 ^d	0,139±0,014 ^d	0,199± 0,008 ^c
4	D-(+)-Galactopiranoose	0,084±0,004 ^a	0,056 ±0,004 ^b	0,024 ±0,002 ^e	0,035±0,002 ^d	0,042±0,001 ^c
6	D-(+)-Turanose	0,069 ±0,006 ^a	0,065 ±0,012 ^a	0,016±0,001 ^d	0,025±0,001 ^c	0,036 ±0,003 ^b
Total		1,010	0,804	0,217	0,297	0,409

Na figura 24, encontra-se graficamente representado o total de açúcares e polióis, ácidos gordos, terpenos, alcanos e esteróis presentes nas folhas de oliveira após um período de recuperação de cada tratamento de *stress*. Analisando a tabela 4 e figura 24, verifica-se que após o período de recuperação os alcanos mantiveram-se os compostos maioritários presentes no perfil lipofílico das folhas de oliveira, seguidos dos ácidos gordos e dos terpenos, porém, houve uma inversão no que diz respeito aos esteróis e aos açúcares, continuando a ser as duas famílias de compostos presentes nas folhas de oliveira em menor quantidade.

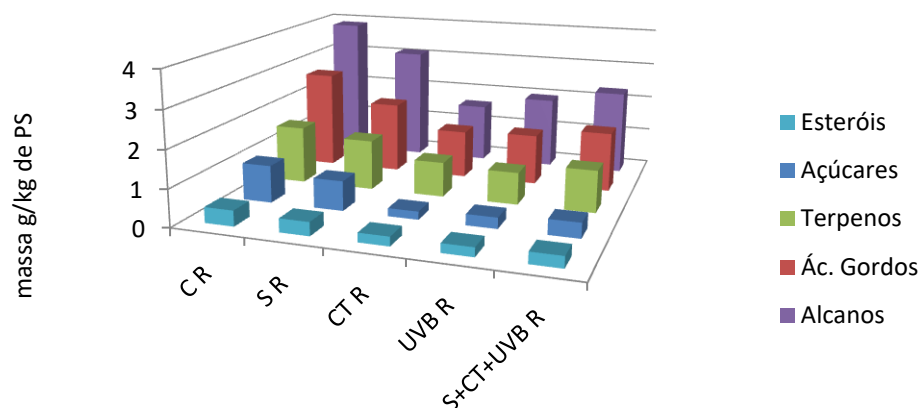
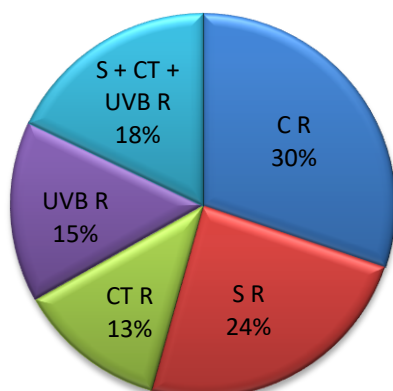


Figura 24. Representação gráfica do total de esteróis, açúcares, terpenos, ácidos gordos e alcanos (g/Kg PS) presentes nas folhas de oliveira após o período de recuperação de cada tratamento – C_R, S_R, C_T_R, UVB_R, S + CT + UVB_R.

A tabela 4, bem como os gráficos das figuras 24, indicam que é no controlo que os alcanos estão em maior quantidade (30%), sendo inferior nas folhas de oliveiras após o período de recuperação aos diferentes tratamentos, e a percentagem mais baixa de alcanos totais encontra-se no grupo C_T_R (13%). No tratamento UVB_R, ao contrário do que aconteceu logo após o tratamento UVB, todos os 6 alcanos foram detetados. De modo geral, após a recuperação, são os alcanos 2 e 4 que se encontram em maior quantidade. As oliveiras em condições de controlo (C_R) apresentaram a maior ($P \leq 0,05$) quantidade de alcanos (1 a 6), como se pode comprovar na figura 25.

Os ácidos gordos sucedem os alcanos, como indica a tabela 4 e a figura 24. Ao contrário do que se verificou logo após os tratamentos de *stress*, no período de recuperação, as folhas de oliveiras em condições de controlo (C_R) apresentaram a maior quantidade de ácidos gordos (30%), seguida do tratamento S_R (22%) e S + CT + UVB (18%) e, em menores quantidades, nos tratamentos C_T_R e UVB_R (15%) (figura 25). O ácido palmítico e o ácido oleico são de novo os ácidos que mais se destacam, estando os restantes presentes em quantidades vestigiais. As folhas de oliveiras em condições de C_R apresentaram a maior ($P \leq 0,05$) quantidade de ácido oleico, enquanto a menor quantidade se encontra no tratamento S+CT+UVB_R (tabela 4). Já o ácido palmítico encontra-se em quantidades idênticas ($P \geq 0,05$) no controlo e tratamentos S_R e S+CT+UVB_R.

Alcanos



Ácidos Gordos

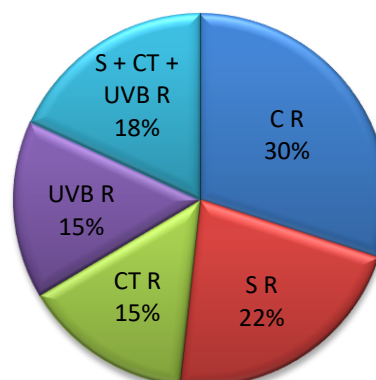


Figura 25. Percentagem de alcanos e ácidos gordos presentes nas folhas de oliveira após o período de recuperação de cada tratamento – C_R, S_R, CT_R, UVB_R, S + CT + UVB_R.

À semelhança do que ocorreu logo após os tratamentos de *stress*, a terceira família de destaque são os terpenos, constituída pelos mesmos compostos, mono e triterpenos, tal como indica a tabela 4 e a figura 24. É no controlo (C_R) que se encontram a maioria dos terpenos (27%), segundo o gráfico da figura 26, seguido do tratamento S_R (23%) e S + CT + UVB_R (19%) e por fim o CT_R e UVB_R (16 e 15%, respetivamente). Verifica-se também que, de modo geral, cada terpeno identificado apresenta uma maioria significativa no tratamento C_R, seguido do S_R, havendo maior semelhança entre os restantes tratamentos. À semelhança do que aconteceu logo após a exposição aos tratamentos de *stress*, o lup-20(29)-en-3-al também é o terpeno que se destaca em todos os tratamentos após recuperação (tabela 4). Contudo, ao contrário do verificado após o *stress*, na recuperação é o aldeído ursólico o segundo maior terpeno encontrado na maioria dos tratamentos (exceto para CT_R e S + CT + UVB_R). As oliveiras a recuperar do tratamento UVB (UVB_R) apresentaram a menor ($P \leq 0,05$) quantidade de lup-20(29)-en-3-al (tabela 4) sendo este composto igual nos restantes tratamentos ($P \geq 0,05$). Já o aldeído ursólico encontra-se em maior ($P \leq 0,05$) quantidade nas folhas em condições de controlo e em menor nos tratamentos C_R, UVB_R e S + CT + UVB_R.

Terpenos

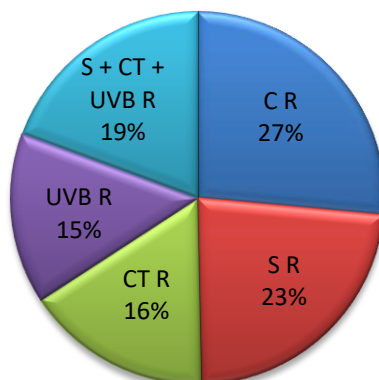
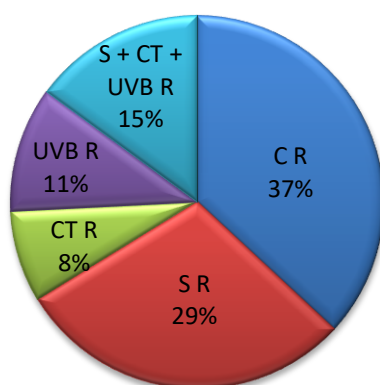


Figura 26. Percentagem de terpenos presentes nas folhas de oliveira após o período de recuperação de cada tratamento – C_R, S_R, CT_R, UVB_R e S + CT + UVB_R.

Ao contrário do que aconteceu nas plantas submetidas aos tratamentos de *stress*, na recuperação os açúcares encontram-se mais elevados que os esteróis, como indicam a tabela 4 e a figura 24. A figura 27 mostra que é no controlo (C_R) que os açúcares se encontram em quantidade mais elevada (37%), seguido do tratamento S_R (29%). À semelhança do verificado logo após os tratamentos de *stress*, também na recuperação o D-sorbitol/D-manitol destaca-se em todos os tratamentos seguido da gluconolactona (tabela 4). A maior ($P \leq 0,05$) quantidade de D-sorbitol/D-manitol foi encontrada nas oliveiras em condições de controlo. Já a gluconolactona encontra-se em igual ($P \geq 0,05$) quantidade do controlo, S_R, UVB_R e S + CT + UVB_R.

Por fim, tal como já foi referido, encontram-se os esteróis: estigmast-5-en-3-ol e o β -sitosterol (tabela 4 e figura 24). De modo geral os esteróis encontram-se mais elevados no controlo (C_R: 27%), seguido do tratamento S_R (23%) e do tratamento S + CT + UVB_R (19%) e, em quantidades inferiores nos tratamentos CT_R e UVB_R (16% e 15%, respetivamente), como se verifica na figura 27. Analisando cada composto individualmente, como se encontra registado na tabela 4, verifica-se que ambos se encontram mais elevados no controlo (C_R), no entanto o β -sitosterol não apresenta diferenças ($P \geq 0,05$) entre este e o tratamento S_R. Também é nos tratamentos CT_R, UVB_R e S + CT + UVB_R que o estigmast-5-en-3-ol se encontra mais baixo ($P \leq 0,05$) em relação ao controlo.

Açúcares e polióis



Esteróis

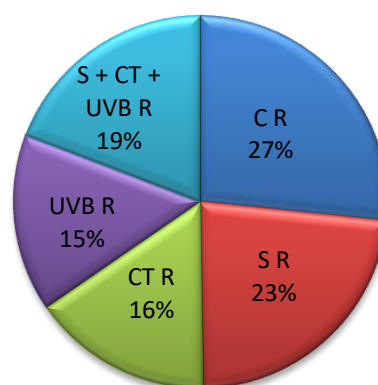


Figura 27. Percentagem açúcares e polióis presentes nas folhas de oliveira após o período de recuperação de cada tratamento – C_R, S_R, CT_R, UVB_R, S + CT + UVB_R.

4. Composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos de folhas de oliveiras após um período de recuperação dos tratamentos de *stress*

A tabela 5 resume a composição fenólica das folhas de oliveira após o período de recuperação de cada tratamento - C_R, S_R, CT_R, UVB_R e S + CT + UVB_R. Através de LC-MS, foram identificados 22 compostos pertencentes às famílias dos flavonoides, secoiridoides, ácidos carboxílicos e derivados do ácido hidroxicinâmico.

Tabela 5. Composição fenólica dos extratos de folhas de oliveira (g/Kg PS) após recuperação de cada tratamento - controlo (C_R), seca (S_R), choque térmico (CT_R), radiação ultravioleta-B (UVB_R) e *stresses* combinados (S + CT + UVB_R). Os valores representam média ± desvio padrão (*n* = 3 - 4). Em cada linha, letras diferentes indicam diferenças estatísticas (*P* ≤ 0,05) entre os tratamentos.

Pico	Composto	m/z	MS2	C _R	S _R	CT _R	UVB _R	S+CT+UVB _R	Referência
Derivados do Ácido Hidroxicinâmico									
10	Verbascósido	623	461	0,103 ± 0,022 ^a	0,087 ± 0,022 ^a	0,064 ± 0,01 ^a	0,074 ± 0,019 ^a	0,109 ± 0,019 ^a	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Kanakis <i>et al.</i> , 2013; Kontogianni <i>et al.</i> , 2013; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
Ácidos Carboxílicos									
1	Ácido Quínico	191	127; 85; 93	1,806 ± 0,100 ^{cd}	2,119 ± 0,111 ^{bc}	2,522 ± 0,029 ^a	1,736 ± 0,139 ^d	2,188 ± 0,225 ^{ab}	(Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a; Spínola <i>et al.</i> , 2014)
4	Ácido Cafeoil-Quínico	353	191	0,279 ± 0,056 ^c	0,358 ± 0,029 ^{bc}	0,481 ± 0,049 ^a	0,271 ± 0,054 ^c	0,473 ± 0,029 ^{ab}	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005)
Total				2,085	2,477	3,003	2,007	2,661	
Secoiridoides									
2	Isómero de Oleósido	389	183; 165; 121; 209	0,665 ± 0,087 ^c	0,955 ± 0,080 ^{ab}	0,969 ± 0,080 ^a	0,713 ± 0,035 ^{bc}	1,087 ± 0,172 ^a	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Fu <i>et al.</i> , 2010b; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
3	Tirosol	137	137	0,010 ± 0,003 ^b	0,009 ± 0,003 ^b	0,022 ± 0,005 ^a	0,006 ± 0,0002 ^b	0,023 ± 0,006 ^a	(Sanz <i>et al.</i> , 2012)
5	Oleósido	389	345; 209; 121; 165	0,033 ± 0,008 ^b	0,044 ± 0,007 ^{ab}	0,052 ± 0,003 ^a	0,030 ± 0,001 ^b	0,050 ± 0,011 ^a	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Kanakis <i>et al.</i> , 2013; Sanz <i>et al.</i> , 2012)

Pico	Composto	m/z	MS2	C _R	S _R	CT _R	UVB _R	S+CT+UVB _R	Referência
6	Derivado da Aglicona de Oleuropeína	377	197; 153	0,019 ± 0,005 ^a	0,023 ± 0,004 ^a	0,024 ± 0,004 ^a	0,015 ± 0,001 ^a	0,028 ± 0,007 ^a	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Fu <i>et al.</i> , 2010b)
13	Isômero de Oleuropeína Diglucósido	701	539	0,337 ± 0,067 ^{ab}	0,379 ± 0,011 ^{ab}	0,453 ± 0,106 ^{ab}	0,286 ± 0,034 ^b	0,497 ± 0,043 ^a	(Fu <i>et al.</i> , 2010b; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
16	Metiloleuropeína	553	391; 359	0,072 ± 0,015 ^a	0,004 ± 0,001 ^b	0,013 ± 0,005 ^b	0,008 ± 0,001 ^b	ND	(Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013b)
17	2"-metoxioleuropeína	569	537; 403; 407	0,062 ± 0,015 ^a	ND	0,012 ± 0,003 ^b	0,008 ± 0,001 ^c	0,003 ± 0,0002 ^d	(Talhaoui <i>et al.</i> , 2015)
18	Oleuropeína	539	377; 307; 275	1,363 ± 0,188 ^b	1,445 ± 0,111 ^b	2,347 ± 0,180 ^a	1,300 ± 0,047 ^b	2,251 ± 0,360 ^a	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Fu <i>et al.</i> , 2010b; Kanakis <i>et al.</i> , 2013; Kontogianni <i>et al.</i> , 2013; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a; Sanz <i>et al.</i> , 2012)
21	Isômero de Lucidumósido C	583	537; 403; 223	0,315 ± 0,086 ^c	0,474 ± 0,042 ^b	0,625 ± 0,053 ^a	0,348 ± 0,015 ^{bc}	0,616 ± 0,056 ^a	(Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
22	Ligstrósido	523	361; 291; 259	0,016 ± 0,010 ^c	0,086 ± 0,016 ^a	0,078 ± 0,003 ^a	0,002 ± 0,0003 ^c	0,054 ± 0,010 ^b	(Kontogianni <i>et al.</i> , 2013; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a; Sanz <i>et al.</i> , 2012)
Total				2,8926	3,419	4,5946	2,7155	4,6081	
Flavonoides									
7	Rutina	609	301	0,517 ± 0,171 ^b	0,764 ± 0,055 ^{ab}	0,779 ± 0,09 ^{ab}	0,653 ± 0,136 ^{ab}	0,930 ± 0,048 ^a	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Fu <i>et al.</i> , 2010b)

Pico	Composto	m/z	MS2	C _R	S _R	CT _R	UVB _R	S+CT+UVB _R	Referência
8	Isômero de Rutinósido de Luteolina 1	593	285	0,780 ± 0,137 ^d	1,022 ± 0,071 ^{bc}	1,094 ± 0,114 ^b	0,827 ± 0,089 ^{cd}	1,348 ± 0,027 ^a	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Kanakis <i>et al.</i> , 2013; Kontogianni <i>et al.</i> , 2013)
9	Quercetina- <i>O</i> -hexósido	463	301; 300	0,066 ± 0,005 ^{ab}	0,115 ± 0,019 ^a	0,020 ± 0,007 ^b	0,064 ± 0,027 ^{ab}	0,122 ± 0,038 ^a	(Jaiswal <i>et al.</i> , 2012)
11	Apigenina-7- <i>O</i> -rutinósido	577	269	0,126 ± 0,042 ^a	0,062 ± 0,012 ^{ab}	0,041 ± 0,013 ^b	0,051 ± 0,021 ^b	0,127 ± 0,025 ^a	(Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
12	Quercitina- <i>O</i> -deoxihexósido	447	301; 300	0,197 ± 0,049 ^{ab}	0,210 ± 0,015 ^{ab}	0,219 ± 0,071 ^{ab}	0,152 ± 0,017 ^b	0,286 ± 0,018 ^a	(Spínola <i>et al.</i> , 2014)
14	Isômero de Glucósido de Luteolina	447	285	0,613 ± 0,084 ^a	0,835 ± 0,074 ^a	0,903 ± 0,143 ^a	0,636 ± 0,024 ^a	0,869 ± 0,157 ^a	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Fu <i>et al.</i> , 2010b; Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2013a)
15	7- <i>O</i> -(Glucopiranosil-D)-crisoeriol	461	299; 446	0,333 ± 0,064 ^b	0,687 ± 0,054 ^a	0,645 ± 0,164 ^a	0,499 ± 0,014 ^{ab}	0,668 ± 0,115 ^a	(Fu <i>et al.</i> , 2010b)
19	Isômero de Rutionósido de Luteolina 2	539	285	2,054 ± 0,386 ^b	3,044 ± 0,245 ^a	3,449 ± 0,361 ^a	2,118 ± 0,120 ^b	3,475 ± 0,348 ^a	(Cardoso <i>et al.</i> , 2005; Kanakis <i>et al.</i> , 2013; Kontogianni <i>et al.</i> , 2013)
20	Derivado do Campferol	583	285	1,943 ± 0,374 ^c	2,780 ± 0,011 ^b	3,100 ± 0,211 ^a	1,982 ± 0,017 ^b	3,393 ± 0,208 ^a	(Spínola <i>et al.</i> , 2014)
Total				6,629	9,520	10,251	6,982	11,218	

ND – não detetado

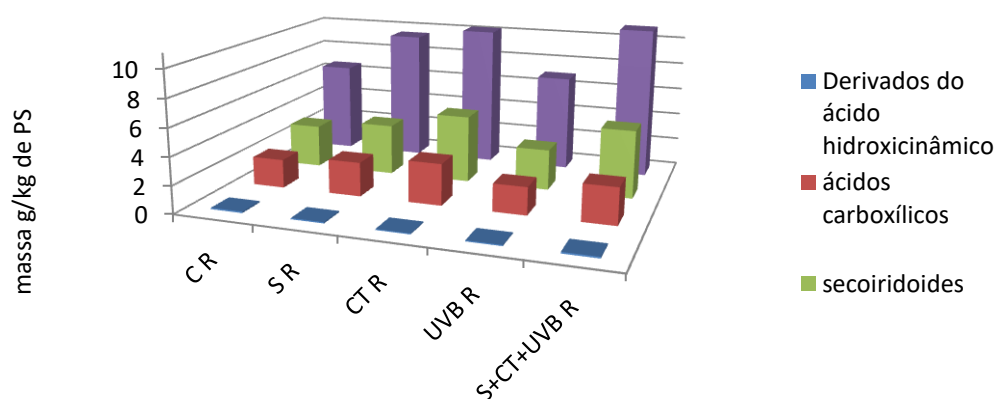


Figura 28. Representação gráfica do total de derivados do ácido hidroxicinâmico, ácidos carboxílicos, secoiridoides, e flavonoides (g/Kg PS) presentes nas folhas de oliveira após o período de recuperação –C_R, S_R, CT_R, UVB_R e S + CT + UVB_R.

Da análise da tabela 5 e da figura 28 verifica-se que a grande maioria dos compostos identificados por LC-MS nas folhas de oliveira após o período de recuperação são flavonoides seguido dos secoiridoides e dos ácidos carboxílicos e, em minoria, os derivados do ácido hidroxicinâmico.

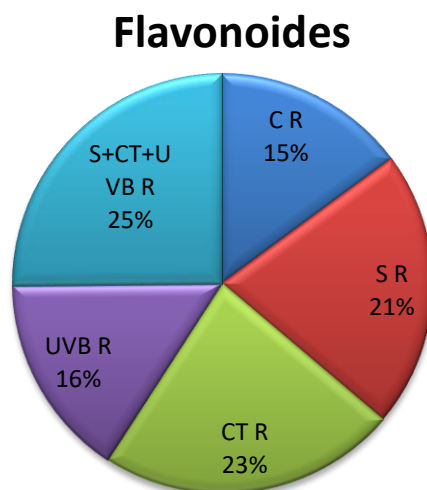


Figura 29. Percentagem de flavonoides presentes nas folhas de oliveira após período de recuperação – C_R, S_R, CT_R, UVB_R e S + CT + UVB_R.

Os flavonoides identificados são 9, tal como referido na tabela 5. Estes compostos encontram-se sobretudo nos tratamentos S + CT + UVB_R (25%) e CT_R (23%), tal como indica a figura 29. Em quantidades inferiores estão nos tratamentos C_R (15%) e UVB_R (16%). Estando 21% dos flavonoides no tratamento S_R (figura 29). Os flavonoides mais abundantes, em todos os tratamentos, são ambos os isómeros de rutinósido de luteolina e também o campferol. As maiores ($P \leq 0,05$) quantidades do isómero de rutinósido de luteolina 2 foram encontradas nas oliveiras dos tratamentos S + CT + UVB_R, CT_R e S_R. Já o isómero de rutinósido de luteolina 1 foi encontrado em maior quantidade apenas nas oliveiras do tratamento S + CT + UVB_R. Os tratamentos S + CT + UVB_R e CT_R apresentaram os valores mais elevadas ($P \leq 0,05$) de campferol.

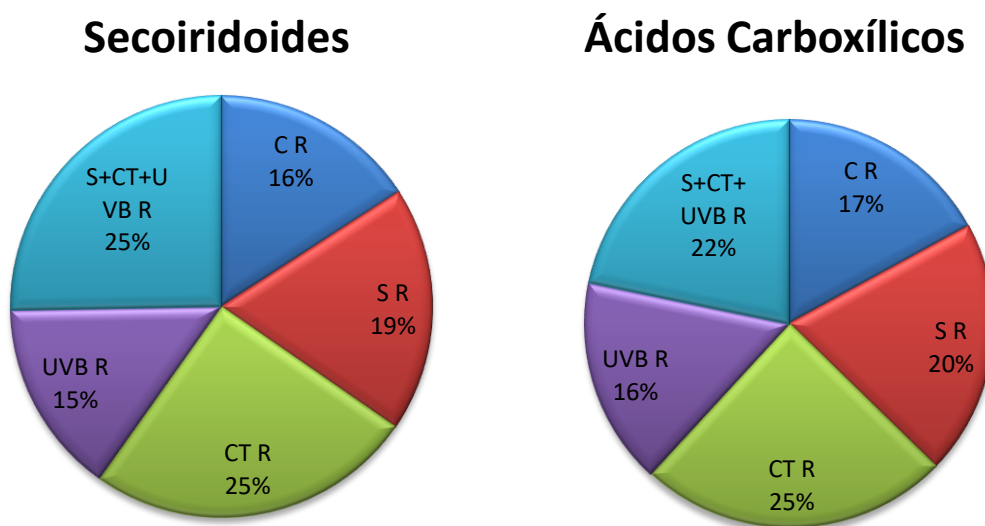


Figura 30. Percentagem de secoiridoides e ácidos carboxílicos presentes nas folhas de oliveira após período de recuperação – C_R, S_R, CT_R, UVB_R e S + CT + UVB_R.

O segundo grupo mais abundante é os secoiridoides, no entanto é inferior a metade dos flavonoides (tabela 5 e figura 28). Os tratamentos S + CT + UVB_R e CT_R, são os que apresentam maior quantidade de secoiridoides, com 25% dos secoiridoides em cada, já os restantes tratamentos variam entre 15% no tratamento UVB_R e 19% no tratamento S_R (figura 30). Á semelhança do que ocorreu nas oliveiras logo após os tratamentos de *stress*, o secoiridoide mais abundante nas folhas de oliveira após recuperação dos tratamentos de

stress é a oleuropeína, que corresponde a cerca de metade do total de secoiridoides. A oleuropeína encontra-se em quantidades superiores nos tratamentos CT_R e S + CT + UVB_R (sem diferença entre eles, $P \geq 0,05$) e em quantidades inferiores nos restantes tratamentos.

Seguem-se os ácidos carboxílicos, tal como indicam a tabela 5 e a Figura 28. Os ácidos carboxílicos estão presentes sobretudo no tratamento CT_R (25%), seguido dos tratamentos S + CT + UVB_R (22%) e S_R (20%), e, em menor quantidade nos tratamentos C_R (17%) e UVB_R (16%), como se encontra representado na Figura 30. O ácido quínico é o ácido carboxílico mais abundante em todos os tratamentos, tal como se verificou nas oliveiras imediatamente após os tratamentos de *stress*. As oliveiras do tratamento CT_R apresentam uma quantidade de ácido quínico superior ($P \leq 0,05$) às dos tratamentos S_R, UVB_R e C_R (tabela 5).

Por fim, encontra-se o verbascósido, o único derivado do ácido hidroxicinâmico identificado, tal como se observa na tabela 5. A quantidade de verbascósido presente nos diferentes tratamentos varia entre 0,109 e 0,064 g de composto/ Kg de folhas secas, no entanto não existem diferenças significativas entre os vários tratamentos ($P \geq 0,05$).

Os resultados da atividade antioxidante de cada extrato fenólico das folhas de oliveira após o período de recuperação encontram-se registados na Tabela 6. Da análise da tabela verifica-se que a atividade antioxidante varia entre 0,149 e 0,124, no entanto, os diferentes tratamentos não apresentam diferenças estatísticas entre si ($P \geq 0,05$).

Tabela 6. Atividade antioxidante (mg equiv quercetina mg⁻¹ extrato) do perfil fenólico de cada extrato de folhas de oliveira após o período de recuperação – C_R, S_R, CT_R, UVB_R e S + CT + UVB_R. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n = 5$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos.

	C _R	S _R	CT _R	UVB _R	S + CT + UVB _R
AA	0,124 \pm 0,028 ^a	0,119 \pm 0,037 ^a	0,140 \pm 0,034 ^a	0,149 \pm 0,033 ^a	0,124 \pm 0,033 ^a

DISCUSSÃO

Existem diversos trabalhos que focam apenas o efeito de um stress abiótico na fisiologia da oliveira (ex. Bacelar et al. 2006, Koubouris et al. 2015) e poucos estudam o seu efeito no metabolismo ou perfil de metabolitos das folhas (Liakopoulos et al. 2006). Também a aplicação de vários stresses abióticos em simultâneo e os seus efeitos na oliveira é praticamente desconhecida. Nogués et al. (2000) apresentam um trabalho de campo em oliveiras sobre o efeito da seca e radiação UVB, mas estuda apenas os seus efeitos a nível fotossintético. O presente trabalho descreve pela primeira vez o perfil, fenólico e lipofílico, de folhas de oliveiras expostas a três stresses abióticos em simultâneo e descreve também a seu perfil após recuperação dos stresses. Desta análise foram identificados 49 compostos pertencentes a dez famílias (com poucas exceções) e demonstrou-se a que a aplicação de stresses, quer individualmente quer em conjunto, altera a produção de vários compostos, nomeadamente os compostos fenólicos que tem um elevado interesse industrial e farmacêutico.

1. Perfil de metabolitos nas folhas de oliveira da variedade Cobrançosa

Os compostos presentes nas folhas de oliveira podem depender de fatores como a variedade de oliveira, a estação do ano, o local onde a planta se desenvolve entre outros (Brahmi *et al.*, 2014; Malheiro *et al.*, 2016; Romero *et al.*, 2016). Na variedade estudada (Cobrançosa) os compostos que mais se destacaram foram os flavonoides, os alcanos e os secoiridoides. Também na literatura são os compostos fenólicos (flavonoides e secoiridoides) que mais se evidenciam nas folhas de oliveira de diferentes variedades, entre eles destacam-se alguns secoiridoides, como a oleuropeína, derivado da aglicona de oleuropeína, ligstrósido, hidroxitirosil, oleósido, e flavonoides, como o isómero de glucósido de luteolina (Kontogianni *et al.*, 2013; Quirantes-Piné *et al.*, 2013b; Romero-García *et al.*, 2016). Igualmente, nos resultados obtidos evidenciou-se a oleuropeína, como principal secoiridoide, contudo, contrariamente aos restantes autores, os principais flavonoides detetados no presente trabalho foram os isómeros de luteolina e o campferol. Relativamente aos alcanos, geralmente encontram-se nas folhas de oliveira alcanos de

cadeia longa (entre n-C₂₉ e n-C₃₃) (Mihailova *et al.*, 2015), tal como indicam os resultados obtidos em que foram identificados seis alcanos.

Depois dos flavonoides, alcanos e secoiridoides, encontraram-se quantidades consideráveis de ácidos gordos e terpenos. Os ácidos gordos identificados foram seis, destacando-se o ácido palmítico e o ácido oleico que foram os únicos ácidos gordos presentes em quantidades quantificáveis. Estes resultados aproximam-se dos resultados obtidos em oliveiras de outras variedades, onde além do ácido palmítico e do ácido oleico, também se destacou o ácido linolénico (Cavalheiro *et al.*, 2015). Outros ácidos gordos detetados por Cavalheiro *et al.* (2015), ainda que em quantidades inferiores, também foram identificados nas folhas de oliveira em estudo, embora em quantidades vestigiais, como o ácido linoleico e esteárico. Quanto aos terpenos, Olmo-García *et al.* (2016) detetaram quantidades mais elevadas de ácidos oleanólico, maslínico e ursólico. No entanto, no presente trabalho destacaram-se o lupeol e o lup-20(29)-en-3-al e, dos compostos referidos por Olmo-García *et al.* (2016), apenas o ácido ursólico foi detetado.

Em quantidades inferiores surgiram alguns ácidos carboxílicos, derivados do ácido hidroxicinâmico, açúcares e esteróis. Os ácidos carboxílicos detetados nas folhas de oliveira estudadas foram o ácido quínico e o ácido cafeoil-quínico, ambos os compostos foram previamente identificados em folhas de oliveira (ácido quínico) e azeitona (ácido cafeoil-quínico) por Cardoso *et al.* (2005) e Quirantes-Piné *et al.* (2013a), no entanto, não existem na literatura referências á sua quantificação em folhas de oliveira o que pode ser justificado pela sua baixa incidência. Nos resultados obtidos Brahmi *et al.*, (2014) o único derivado do ácido hidroxicinâmico referido foi o ácido cumárico, no entanto, Quirantes-Piné *et al.* (2013b) identificaram o verbascósido e o isoverbascósido. Neste trabalho foi também identificado apenas um derivado do ácido hidroxicinâmico, o verbascósido. No que diz respeito aos açúcares presentes nas folhas de oliveira, estudos indicaram que a maioria corresponde à glucose (Romero-García *et al.*, 2016). Todavia, os resultados obtidos demonstram que o manitol se encontra em concentrações superiores, correspondendo ao açúcar maioritário nas folhas de oliveira analisadas, resultados que já tinham sido obtidos por Oddo *et al.* (2002). Por fim os esteróis identificados foram dois, o β -sitosterol e estigmast-5-en-3-ol, predominando o β -sitosterol, tal como anteriormente

verificado por Orozco-Solano *et al.* (2010a, 2010b). No entanto, os referidos autores detetaram ainda a presença de campesterol, colesterol e avenasterol.

2. Perfil de metabolitos e atividade antioxidante das folhas de oliveira após exposição a *stresses* e recuperação

Uma forma de proteção das plantas contras os *stresses* ambientais é a presença de ceras epicuticulares (Mihailova *et al.*, 2015). Na oliveira as ceras epicuticulares têm um papel muito importante, principalmente em condições de seca, pois aumenta a resistência à difusão de vapor de água pela membrana cuticular, restringindo a transpiração através dos estomas, e consequentemente prevenindo a desidratação (Bacelar *et al.*, 2006). Na oliveira, os principais componentes destas ceras são triterpenos (maioritariamente eritradiol e α - e β -amirina), alcanos de cadeia longa, álcoois, aldeídos, ácidos gordos (C₁₆ - C₂₈) e ésteres de alquilo, podendo variar a sua composição e quantidade nas folhas de diferentes variedades de oliveira (Bianchi *et al.*, 1992; Mihailova *et al.*, 2015).

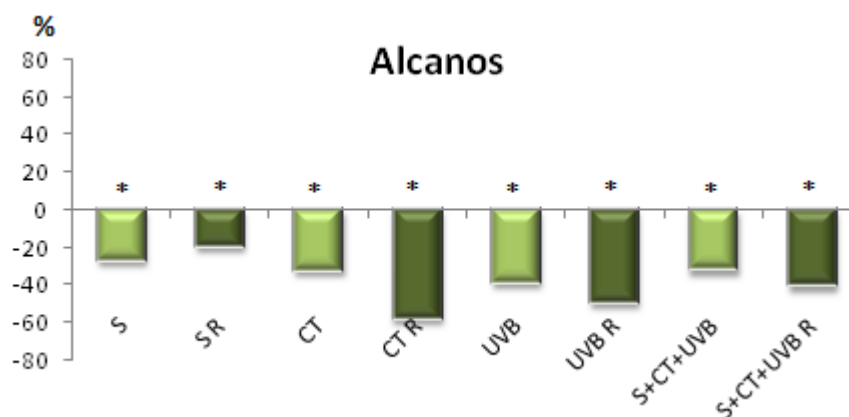


Figura 31. Alterações verificadas nos alcanos presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos (valores positivos indicam que houve aumento e valores negativos indicam que houve diminuição). * - diferença significativa entre os tratamentos.

Os alcanos são um dos principais constituintes das ceras epicuticulares das plantas (Le Provost *et al.*, 2013). Vários estudos indicaram que *stresses* ambientais, como por exemplo a radiação elevada de UVB aumentou a quantidade de n-alcanos presentes nas folhas de *Nicotiana tabacum* (planta do tabaco), enquanto as temperaturas elevadas durante o desenvolvimento da folha de *Citrus aurantium* (laranjeira) diminuiu as quantidades de

alcanos (Shepherd e Wynne Griffiths, 2006). Já o *stress* hídrico reduziu a quantidade de alcanos das folhas de *Arachis hypogaea* (planta do amendoim) enquanto outros estudos em *Gossypium hirsutum* (algodoeiro) demonstraram um aumento dos alcanos (Shepherd e Wynne Griffiths, 2006). No presente trabalho tanto após a aplicação de *stress* como após a recuperação, a tendência foi sempre para diminuir a quantidade destes compostos (figura 31).

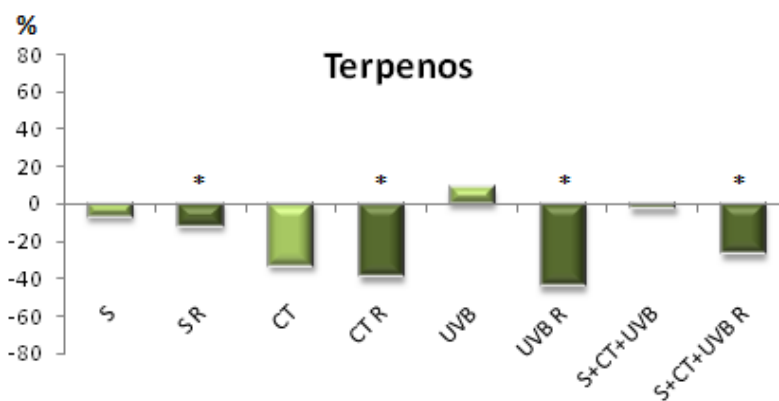


Figura 32. Alterações verificadas nos terpenos presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos (valores positivos indicam que houve aumento e valores negativos indicam que houve diminuição). * - diferença significativa entre os tratamentos.

Os terpenos, para além de serem constituintes das ceras, apresentam também atividade antioxidante (Allouche *et al.*, 2010). Estudos anteriores demonstraram que tanto o *stress* hídrico como a radiação elevada de UVB provocaram um aumento da produção de terpenos em outras espécies (Gil *et al.*, 2012; Savoi *et al.*, 2016). Em relação á temperatura, uma diminuição da quantidade de monoterpenos foi registada em *Pseudotsuga menziesii* (Snow *et al.*, 2003). O aumento dos terpenos em resposta a *stresses* abióticos está relacionado com a sua capacidade antioxidante, por exemplo o aumento de timol- β -D-glucopiranosido em resposta ao *stress* está relacionado com a sua capacidade de neutralizar radicais livres que provocam danos nas plantas (Yu *et al.*, 2016). Neste trabalho, verificou-se que logo após os *stresses* o perfil destes metabolitos manteve-se mas, após o período de recuperação diminuiu (figura 32).

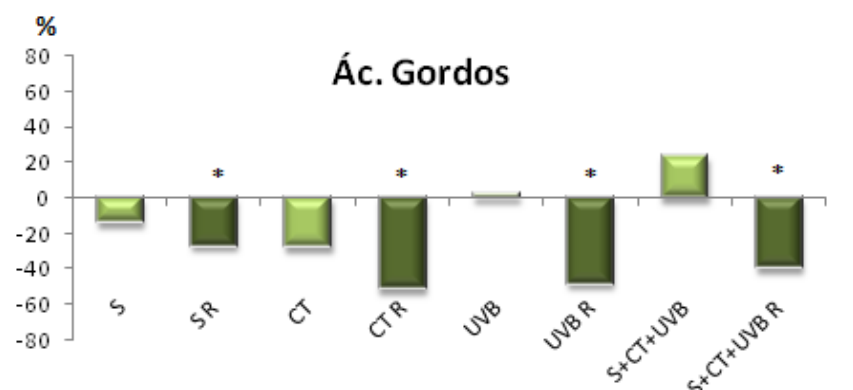


Figura 33. Alterações verificadas nos ácidos gordos presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos (valores positivos indicam que houve aumento e valores negativos indicam que houve diminuição). * - diferença significativa entre os tratamentos.

Os ácidos gordos, para além de se encontrarem nas ceras, são também constituintes importantes das membranas. Estudos em oliveira demonstraram que o aumento da temperatura reduziu a quantidade dos ácidos gordos insaturados, nomeadamente do ácido oleico, e aumentou os ácidos gordos saturados, como o ácido palmítico (Donaire e Lopez-Gorgé, 1978; Nejad e Niroomand, 2007). Também em *Arabidopsis*, o aumento da temperatura alterou a composição dos ácidos gordos das membranas diminuindo os níveis de ácidos gordos insaturados e aumentando os níveis dos ácidos saturados. Toumi *et al.* (2008) demonstraram que, na videira, a seca aumentou a quantidade dos ácidos gordos insaturados, enquanto Zhong *et al.* (2011) obtiveram resultados contrários, a seca provocou uma descida dos ácidos gordos insaturados. Na variedade de oliveira Chemlali, a seca diminui a quantidade de ácido esteárico e oleico e aumentou a de ácido linolénico, enquanto na variedade Chetoui diminuiu a quantidade de ácido palmitoleico, esteárico e linoleico e aumentou a de ácido linolénico (Guerfel *et al.* 2008). Relativamente à radiação elevada de UVB, alguns estudos em várias espécies não reportaram alterações significativas na composição de ácidos gordos das folhas (Young *et al.*, 2006). Contudo, outros estudos demonstraram que a radiação UVB pode destruir os ácidos gordos insaturados levando à perda da integridade da membrana (Kataria *et al.*, 2014). Já neste estudo, nenhum dos *stresses* afetou de modo significativo os ácidos palmítico e oleico presentes nas folhas de oliveira, mas durante a recuperação a quantidade destes diminuiu (figura 33). A divergência entre os resultados obtidos e a literatura pode ser explicada, por

exemplo, por diferenças na intensidade e a duração de exposição aos *stresses* e também pela espécie em si.

A ausência de alterações no perfil de resposta dos alcanos, terpenos e ácidos gordos logo após a aplicação dos *stresses*, pode indicar que os tratamentos de *stress* não foram suficientes (severos) para induzir um aumento significativo das ceras epicuticulares como primeira resposta aos *stresses*. Sendo que a oliveira é uma espécie bem adaptada a *stresses* abióticos outros mecanismos, morfológicos ou fisiológicos, de resposta aos *stresses* podem ter sido despoletados, por exemplo, o aumento do enrolamento foliar e a exposição vertical das folhas para minimizar a quantidade de radiação intercetada ou o fecho estomático e a redução do número e do tamanho dos estomas para diminuir a perda de água em condições de seca e calor (Bacelar *et al.* 2006). Já a redução dos alcanos, terpenos e ácidos gordos durante o período de recuperação sugere que estes compostos poderão estar associados a mecanismos de restabelecimento da oliveira.

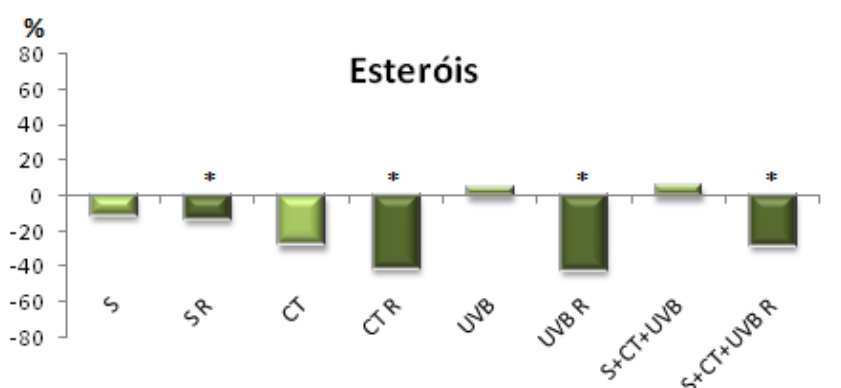


Figura 34. Alterações verificadas nos esteróis presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos (valores positivos indicam que houve aumento e valores negativos indicam que houve diminuição).

Para além dos alcanos, terpenos e ácidos gordos, os esteróis são também constituintes importantes das membranas. Sendo que estes compostos têm um papel importante na regulação da fluidez, e também estão envolvidos na modulação da atividade de algumas enzimas relacionadas com a membrana. Em folhas de videira verificou-se um aumento da estabilidade da membrana após a exposição a radiação elevada de UVB que foi associado ao aumento do β -sitosterol (Berli *et al.*, 2010). Os resultados obtidos indicam que logo a exposição aos *stresses* não se verificou alteração nos esteróis, havendo uma redução significativa nestes compostos após o período de recuperação (figura 34). A

ausência de alterações nestes compostos logo após os tratamentos de *stress* sugere que não houve danos nas membranas, provavelmente porque esta espécie é muito tolerante a *stresses* abióticos (Bacelar *et al.*, 2006). A redução dos esteróis durante o período de recuperação pode significar que estes compostos poderão estar associados a outros mecanismos de recuperação da planta.

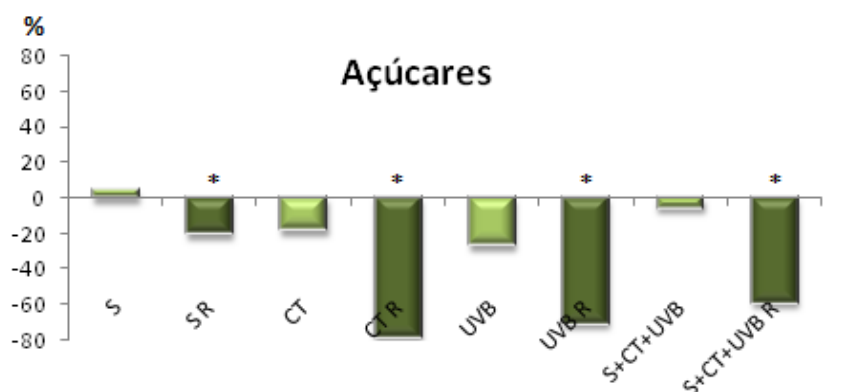


Figura 35. Alterações verificadas nos açúcares presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos (valores positivos indicam que houve aumento e valores negativos indicam que houve diminuição).

Os açúcares são a principal fonte de energia produzida pelas plantas, mas também apresentam um papel importante a nível estrutural, nomeadamente na constituição da parede celular, e podem contribuir para o ajuste osmótico (Gómez-González *et al.*, 2010). Na oliveira, a seca conduz à acumulação de açúcares nas folhas de modo a manter pressão osmótica e preservar a integridade das membranas (Bacelar *et al.*, 2006). Porém, noutras espécies, a radiação UVB tanto induziu um aumento (Araújo *et al.*, 2016) como diminuição (Salama *et al.*, 2011) de açúcares. Já as temperaturas elevadas também favoreceram o aumento na produção de açúcares para regular a atividade osmótica e proteger as estruturas celulares (manter a estabilidade das membranas) (Bita e Gerats, 2013). Neste trabalho, a aplicação dos tratamentos de *stress* não provocou alteração no perfil de açúcares, no entanto, após a recuperação estes diminuíram (figura 35). Esta diminuição após o período de recuperação pode dever-se à utilização dos açúcares disponíveis para a regeneração da planta nomeadamente repor o crescimento (Araújo *et al.*, 2016; Bacelar *et al.*, 2006).

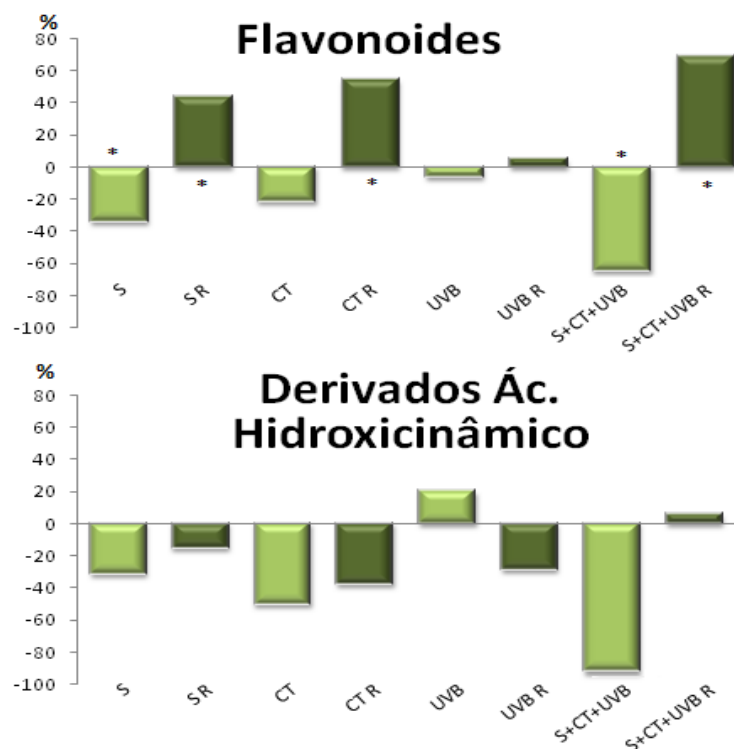


Figura 36. Alterações verificadas nos flavonóides e derivados do ácido hidroxicinâmico presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos (valores positivos indicam que houve aumento e valores negativos indicam que houve diminuição).
* - diferença significativa entre os tratamentos.

O aumento de flavonoides e de derivados do ácido hidroxicinâmico em plantas expostas à seca e a elevadas temperaturas pode ser relacionada com a sua capacidade de neutralizar radicais livres (Tattini *et al.*, 2004; Wahid *et al.*, 2007). Também as plantas expostas à radiação UVB têm tendência para produzir flavonoides pois, além da capacidade antioxidante, também têm capacidade de absorver radiação UV (Falcone Ferreyra *et al.*, 2012). Em condições de radiação elevada de UVB, a maior produção de ácido hidroxicinâmico tem como principal função formar uma barreira de proteção que impede a penetração da radiação UVB na planta (Kolb *et al.*, 2003). Assim, era esperado um aumento geral da quantidade destes compostos nas folhas de oliveira após os tratamentos de *stress*. Contudo, tal como indica a figura 36, esse aumento não se verificou, houve apenas o aumento da quercetina-*O*-hexósido na aplicação de choque térmico, radiação elevada de UVB e *stresses* combinados. Já noutros estudos realizados com outras espécies, a quercetina e a quercetina glicósido foram os flavonoides destacados na resposta ao UVB (Agati *et al.*, 2012). Kolb *et al.* (2003) demonstraram que a radiação UVB induziu especificamente a síntese de flavonoides orto-di-hidroxilados (ex. quercetina). As enzimas

antioxidantes também têm um papel importante na proteção da planta contra espécies reativas de oxigênio formadas como consequência dos *stresses* (Agati *et al.*, 2012), o que poderá ter ocorrido nas oliveiras expostas aos tratamentos de *stress*. Já durante o período de recuperação dos *stresses*, a tendência observada para o aumento de flavonoides (figura 36, em particular isômero de rutinósido de luteolina 1 e 2, 7-*O*-glucopiranosil-D-crisoeriole campferol para S_R, CT_R, S + CT + UVB_R) sugere que houve uma ativação do sistema antioxidante “secundário” (produção de flavonoides) em consequência de uma possível quebra na atividade das enzimas antioxidantes (Agati *et al.*, 2012).

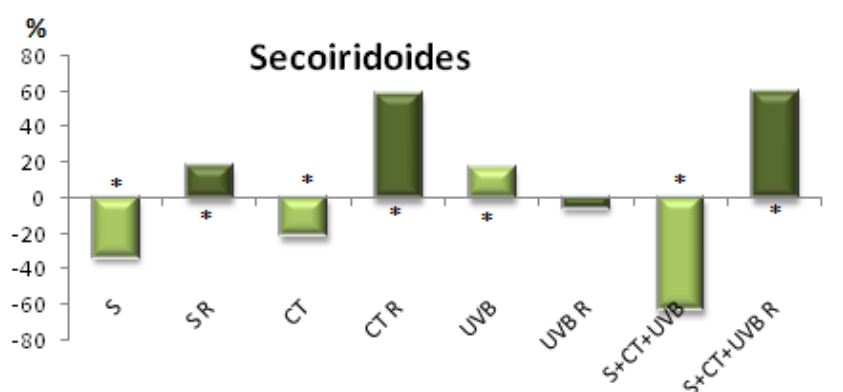


Figura 37. Alterações verificadas nos secoiridoides presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos (valores positivos indicam que houve aumento e valores negativos indicam que houve diminuição).

Existe pouca informação sobre o efeito de *stresses* abióticos no perfil de secoiridoides, e em *Ligustrum vulgare* (alfeneiro) o papel destes compostos em resposta à seca parece ser pouco significativo (Tattini *et al.*, 2004). Também em oliveira os secoiridoides parecem ter um papel pouco relevante em resposta à seca, temperatura elevada e *stresses* combinados uma vez que, de um modo geral, a quantidade destes compostos diminuiu (figura 37). Já na resposta à radiação de UVB a oleuropeína, 2''-metoxioleuropeína, oleósido e seus isómeros poderão ter tido uma função protetora na planta atuando na neutralização de radicais livres (Kontogianni e Gerothanassis, 2012). Tattini *et al.*, (2004) evidenciaram a oleuropeína como sendo um composto relevante na proteção contra efeitos nocivos provocados pela seca. Já na recuperação de S_R, CT_R e S + CT + UVB_R, o aumento destes compostos (isômero de oleósido, tirosol, oleuropeína, lucidumósido C, ligstrósido) nas folhas de oliveira indicaram um possível envolvimento na regeneração e defesa da planta (Alagna *et al.*, 2016) durante este período.

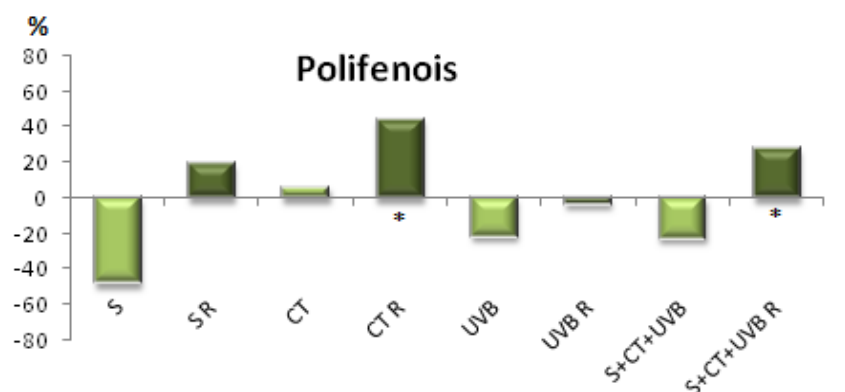


Figura 38. Alterações verificadas nos polifenóis presentes nas folhas de oliveira durante a exposição e recuperação dos diferentes tratamentos relativamente aos respetivos controlos (valores positivos indicam que houve aumento e valores negativos indicam que houve diminuição).

À semelhança do que se verificou para os flavonoides e os secoiridoides, também os polifenóis, ácido quínico e ácido cafeoil-quínico, logo após os tratamentos de *stress*, de modo geral, não alteraram o seu perfil (figura 38). Contudo, no tratamento UVB verificou-se um aumento do ácido cafeoil-quínico, também Casati e Walbot (2004), em *Zea mays* (milho), verificaram um aumento de ácido quínico em resposta a radiação UVB elevada. Também após exposição a um choque térmico, Chaves *et al.* (2011) registaram um aumento de ácido quínico em plantas jovens de *Quercus suber* (sobreiro). A análise dos resultados após a recuperação das oliveiras (figura 38) demonstrou que o choque térmico teve um efeito mais acentuado na produção destes compostos, justificando também o aumento nos *stresses* combinados. Possivelmente as condições energéticas favoráveis durante a recuperação levaram a um aumento da produção e armazenamento de ácido quínico e derivados (Herrmann, 1995).

A figura 39 sumariza as alterações verificadas (aumento, diminuição ou sem alteração) nas principais famílias de compostos identificados nas folhas de oliveiras. Existem diversas interligações entre diferentes vias metabólicas existentes nas folhas de oliveira, o que pode explicar o favorecimento da produção de alguns compostos em detrimento de outros. Tal ocorrência torna a manipulação os diferentes tratamentos de *stress* uma interessante forma de controlar a produção de compostos, principalmente fenólicos, com interesse industrial e farmacêutico. O facto de não haver alteração em muitas famílias de compostos, principalmente lipofílicos (açúcares e polióis, ácidos gordos, terpenos e esteróis) e também ácido hidroxicinâmico, logo após a exposição ao

stress, pode estar relacionado com a tolerância da oliveira a *stresses* abióticos (Bacelar *et al.* 2006). Já a diminuição da quantidade destes compostos durante o período de recuperação pode estar relacionada com a reposição do crescimento e manutenção celular, ou então podem estar a ser favorecidas outras vias de produção de outros compostos (flavonoides, secoiridoides e ácido quínico) em detrimento destas (figura 39). Tendo em conta os dados disponíveis na literatura para oliveira e outras espécies, é de notar que a divergência entre esses dados e os resultados obtidos neste trabalho pode ser explicada, por exemplo, por diferenças na aplicação, intensidade e duração de exposição aos *stresses* e também pela variedade e espécie em si.

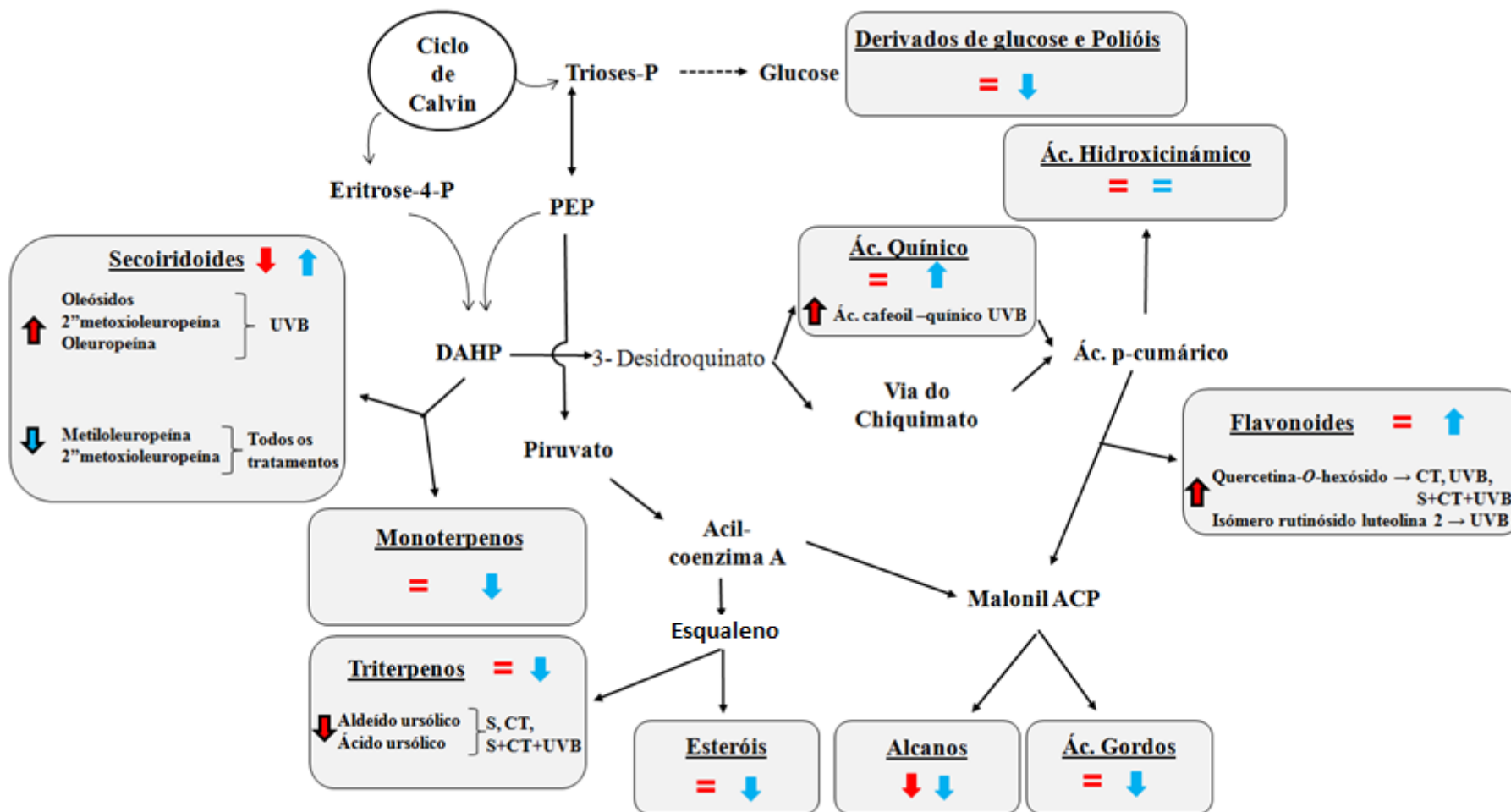


Figura 39. Esquema síntese das alterações verificadas (para cada rectângulo cinzento a ↑ indica aumento, ↓ diminuição ou = sem alteração) nas principais famílias de compostos identificados nas folhas de oliveiras logo após os tratamentos de stress e após o período de recuperação. As setas a vermelho correspondem aos resultados gerais obtidos para os tratamentos S, CT, UVB e S + CT + UVB, e as azuis correspondem aos resultados gerais obtidos para os tratamentos S_R, CT_R, UVB_R e S + CT + UVB_R. Setas azuis e vermelhas com contorno preto indicam casos específicos de descida ou subida de determinados compostos (dentro das famílias identificadas) após um ou vários tratamentos específicos. DAHP - 3-deoxi-D-arabinoeptulose 7-fosfato, P - fosfato, PEP - fosfoenolpiruvato.

A atividade antioxidante (AA) de diferentes extratos de folhas de oliveira está relacionada com a quantidade de compostos fenólicos que neles se encontram, tal como observaram Brahmi *et al.* (2014) e Kontogianni e Gerothanassis (2012), através da determinação da AA (pelo método de DPPH) de extratos de folhas de oliveira com diferentes concentrações de compostos fenólicos. Seria por isso de esperar um aumento na AA dos extratos de folhas de oliveira após o período de recuperação, onde houve um aumento de algumas famílias de compostos fenólicos. No entanto, apesar das alterações verificadas no perfil fenólico dos diferentes extratos, estas alterações não se refletem na sua AA (figura 40). Apesar dos referidos trabalhos terem utilizado o mesmo método para a avaliação da AA, as folhas de oliveira apresentam um perfil metabólico complexo que poderá interferir com a AA, não dependendo apenas dos compostos quantificados.

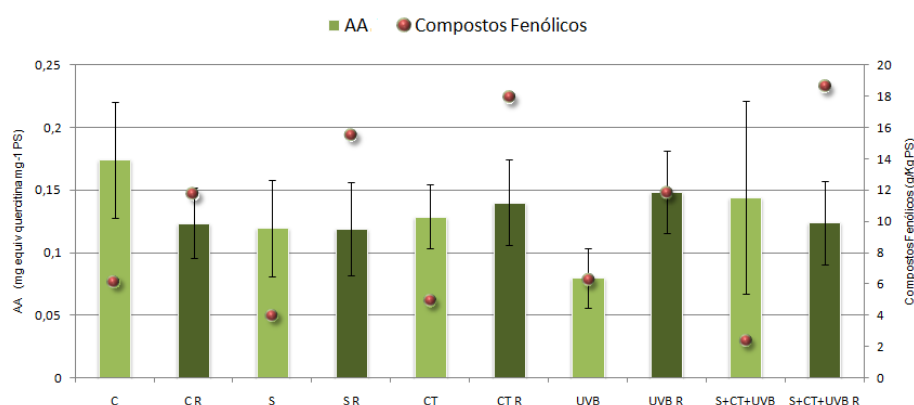


Figura 40. Representação gráfica da AA (mg equiv quercitina mg⁻¹ PS) dos extratos fenólicos obtidos de folhas de oliveira expostas a cada tratamento bem como a sua composição fenólica (g/Kg PS). * - diferença significativa entre os tratamentos.

CONCLUSÃO

Neste trabalho é apresentado pela primeira vez o perfil, fenólico e lipofílico, de folhas de oliveiras expostas a três stresses abióticos em simultâneo. As folhas de oliveira em estudo apresentaram um perfil metabólico semelhante ao que se encontra descrito na literatura, na qual são destacados os compostos fenólicos, como oleuropeína, isómero de rutinósido de luteolina e campferol, e também os alcanos. Podem também ser extraídos das folhas, embora em quantidades inferiores, alguns ácidos gordos, terpenos, esteróis, açúcares, derivados do ácido hidroxicinâmico e ácidos carboxílicos.

O perfil de metabolitos da folha de oliveira não é constante, alterando-se em resposta aos diferentes tratamentos de *stress* a que as oliveiras foram submetidas. De um modo geral, não se verificaram alterações provocadas pelos tratamentos de *stress* no perfil de metabolitos presentes nas folhas de oliveira em estudo, com exceção da redução de alcanos e secoiridoides. No entanto, o tratamento com radiação elevada de UVB conduziu ao aumento de alguns secoiridoides, como oleósidos, 2''-metoxioleuropeína e oleuropeína, alguns flavonoides, nomeadamente quercetina-*O*-hexósido e isómero de rutinósido de luteolina, e do ácido cafeoil-quínico, sendo estes os compostos mais importantes na planta em resposta ao referido tratamento. Também durante a recuperação estas famílias de compostos, secoiridoides e flavonoides, apresentaram um papel de destaque a par com o ácido quínico. Já as restantes famílias de compostos identificadas, nomeadamente compostos lipofílicos (açúcares e polióis, ácidos gordos, terpenos e esteróis) e também ácido hidroxicinâmico, não desempenharam um papel fulcral para a manutenção e recuperação da planta quer durante quer após um período de *stress*.

Já a nível da atividade antioxidante, não se verificou uma relação entre as alterações provocadas pelos diferentes tratamentos de *stress* nos metabolitos presentes nas folhas de oliveira e os resultados obtidos pelo método do DPPH.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que, a aplicação de *stresses* abióticos em oliveiras Cobrançosa, em particular a radiação elevada de UVB, poderá ser usada para modular, a nível das folhas, a produção de alguns compostos fenólicos com interesse industrial e farmacêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abaza, L., Talorete, T.P.N., Yamada, P., Kurita, Y., Zarrouk, M., and Isoda, H. (2007). Induction of Growth Inhibition and Differentiation of Human Leukemia HL-60 Cells by a Tunisian Gerboui Olive Leaf Extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 1306–1312.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., and Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 196, 67–76.
- Aguilera, F., Ruiz, L., Fornaciari, M., Romano, B., Galán, C., Oteros, J., Dhiab, A.B., Msallem, M., and Orlandi, F. (2014). Heat accumulation period in the Mediterranean region: phenological response of the olive in different climate areas (Spain, Italy and Tunisia). *International Journal of Biometeorology* 58, 867–876.
- Ahmed, C.B., Rouina, B.B., Sensoy, S., Boukhris, M., and Abdallah, F.B. (2009). Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany* 67, 345–352.
- Ahuja, S. (2003). *Chromatography and Separation Science* (Academic Press).
- Alagna, F., Geu-Flores, F., Kries, H., Panara, F., Baldoni, L., O'Connor, S.E., and Osbourn, A. (2016). Identification and Characterization of the Iridoid Synthase Involved in Oleuropein Biosynthesis in Olive (*Olea europaea*) Fruits. *The Journal of Biological Chemistry*. 291, 5542–5554.
- Alirezalu, K., Hesari, J., Eskandari, M.H., Valizadeh, H., and Sirousazar, M. (2016). Effect of Green Tea, Stinging Nettle and Olive Leaves Extracts on the Quality and Shelf Life Stability of Frankfurter Type Sausage. *Journal of Food Processing and Preservation* n/a-n/a.
- Allouche, Y., Beltrán, G., Gaforio, J.J., Uceda, M., and Mesa, M.D. (2010). Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2885–2890.
- Allouche, Y., Warleta, F., Campos, M., Sánchez-Quesada, C., Uceda, M., Beltrán, G., and Gaforio, J.J. (2011). Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 121–130.
- Andrewes, P., Busch, J.L.H.C., de Joode, T., Groenewegen, A., and Alexandre, H. (2003). Sensory Properties of Virgin Olive Oil Polyphenols: Identification of Deacetoxy-ligstroside Aglycon as a Key Contributor to Pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1415–1420.
- Anter, J., Fernández-Bedmar, Z., Villatoro-Pulido, M., Demyda-Peyras, S., Moreno-Millán, M., Alonso-Moraga, Á., Muñoz-Serrano, A., and Luque de Castro, M.D. (2011). A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 723, 165–170.
- Araújo, M., Santos, C., Costa, M., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., and Dias, M.C. (2016). Plasticity of young *Moringa oleifera* L. plants to face water deficit and UVB radiation challenges. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 162, 278–285.
- Bacelar, E.A., Santos, D.L., Moutinho-Pereira, J.M., Gonçalves, B.C., Ferreira, H.F., and Correia, C.M. (2006). Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science* 170, 596–605.
- Ben Salem, M., Affes, H., Ksouda, K., Sahnoun, Z., Zeghal, K.M., and Hammami, S. (2015). Pharmacological Activities of *Olea europaea* Leaves. *Journal of Food Processing and Preservation* 39, 3128–3136.

- Berli, F.J., Moreno, D., Piccoli, P., Hespanhol-Viana, L., Silva, M.F., Bressan-Smith, R., Cavagnaro, J.B., and Bottini, R. (2010). Absciscic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant, Cell & Environment* 33, 1–10.
- Bianchi, G., Murelli, C., and Vlahov, G. (1992). Surface waxes from olive fruits. *Phytochemistry* 31, 3503–3506.
- Bitá, C.E., and Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science* 4.
- Blau, K., and Halket, J.M. (1993). *Handbook of derivatives for chromatography* (Wiley).
- Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, I., Fletouris, D., and Papageorgiou, G. (2014). Effect of olive leaf (*Olea europea* L.) extracts on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties enriched with n-3 fatty acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 227–234.
- Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., and Sayadi, S. (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry* 108, 253–262.
- Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M., and Hammami, M. (2014). Variation in antioxidant activity and phenolic content in different organs of two Tunisian cultivars of *Olea europaea* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 36, 169–178.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 28, 25–30.
- Cardoso, S.M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J.A., Renard, C.M., and Coimbra, M.A. (2005). Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 21–32.
- Casati, P., and Walbot, V. (2004). Rapid transcriptome responses of maize (*Zea mays*) to UV-B in irradiated and shielded tissues. *Genome Biology* 5, R16.
- Castellano, J.M., Guinda, A., Macías, L., Santos-Lozano, J.M., Lapetra, J., and Rada, M. (2016). Free radical scavenging and α -glucosidase inhibition, two potential mechanisms involved in the anti-diabetic activity of oleanolic acid. *Grasas Y Aceites* 67.
- Cavalheiro, C.V., Picoloto, R.S., Cichoski, A.J., Wagner, R., de Menezes, C.R., Zepka, L.Q., Da Croce, D.M., and Barin, J.S. (2015). Olive leaves offer more than phenolic compounds – Fatty acids and mineral composition of varieties from Southern Brazil. *Industrial Crops and Products* 71, 122–127.
- Ceriello, A., Esposito, K., La Sala, L., Pujadas, G., De Nigris, V., Testa, R., Bucciarelli, L., Rondinelli, M., and Genovese, S. (2014). The protective effect of the Mediterranean diet on endothelial resistance to GLP-1 in type 2 diabetes: a preliminary report. *Cardiovascular Diabetology* 13, 1.
- Cetinkaya, H., Koc, M., and Kulak, M. (2016). Monitoring of mineral and polyphenol content in olive leaves under drought conditions: Application chemometric techniques. *Industrial Crops and Products* 88, 78–84.
- Chaves, I., Passarinho, J.A.P., Capitão, C., Chaves, M.M., Fevreiro, P., and Ricardo, C.P.P. (2011). Temperature stress effects in *Quercus suber* leaf metabolism. *Journal of Plant Physiology* 168, 1729–1734.
- Donaire, J.P., and Lopez-Gorgé, J. (1978). Lipid Biosynthesis in Leaf and Fruit of Olive. *Journal Experimental Botany* 29, 49–54.
- Ennajeh, M., Vadel, A.M., and Khemira, H. (2009). Osmoregulation and osmoprotection in the leaf cells of two olive cultivars subjected to severe water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum* 31, 711–721.

Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., *et al.* (2013). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine* 368, 1279–1290.

Eurostat (2015). Agriculture, forestry and fishery statistics 2014 edition.

Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P., and Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science* 3.

Franks, F. (2000). Origin and distribution of water in the ecosphere: Water and prehistoric life. In *Water: A Matrix of Life*, (Cambridge: Royal Society of Chemistry), pp. 1–8.

Fu, S., Arráez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Menéndez, J.A., Menéndez-Gutiérrez, M.P., Micol, V., and Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 643–654.

Galán, C., García-Mozo, H., Vázquez, L., Ruiz, L., Guardia, C.D. de la, and Trigo, M.M. (2005). Heat requirement for the onset of the *Olea europaea* L. pollen season in several sites in Andalusia and the effect of the expected future climate change. *International Journal of Biometeorology* 49, 184–188.

Galli, G., and Caruso, D. (2002). Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 677–684.

Gemas, V.J.V., Almadaním, M.C., Tenreiro, R., Martins, A., and Fevereço, P. (2004). Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51, 501–511.

Gil, M., Pontin, M., Berli, F., Bottini, R., and Piccoli, P. (2012). Metabolism of terpenes in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf tissues to UV-B radiation. *Phytochemistry* 77, 89–98.

Gómez-del-Campo, M. (2013). Summer deficit-irrigation strategies in a hedgerow olive orchard cv. “Arbequina”: effect on fruit characteristics and yield. *Irrigation Science* 31, 259–269.

Gómez-González, S., Ruiz-Jiménez, J., Priego-Capote, F., and Luque de Castro, M.D. (2010). Qualitative and Quantitative Sugar Profiling in Olive Fruits, Leaves, and Stems by Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS) after Ultrasound-Assisted Leaching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12292–12299.

Green, A.S., and Fascetti, A.J. (2016). Meeting the Vitamin A Requirement: The Efficacy and Importance of β -Carotene in Animal Species. *The Scientific World Journal* 2016.

Guerfel, M., Baccouri, O., Boujnah, D., and Zarrouk, M. (2008). Changes in lipid composition, water relations and gas exchange in leaves of two young “Chemlali” and “Chetoui” olive trees in response to water stress. *Plant and Soil* 311, 121–129.

Guerfel, M., Baccouri, O., Boujnah, D., Chaïbi, W., and Zarrouk, M. (2009a). Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 119, 257–263.

Guerfel, M., Ouni, Y., Boujnah, D., and Zarrouk, M. (2009b). Photosynthesis parameters and activities of enzymes of oxidative stress in two young “Chemlali” and “Chetoui” olive trees under water deficit. *Photosynthetica* 47, 340.

Guinda, Á., Rada, M., Delgado, T., Gutiérrez-Adánez, P., and Castellano, J.M. (2010). Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 9685–9691.

Guinda, Á., Castellano, J.M., Santos-Lozano, J.M., Delgado-Hervás, T., Gutiérrez-Adánez, P., and Rada, M. (2015). Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *LWT - Food Science and Technology* 64, 431–438.

- Hayes, J.E., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M.N., and Kerry, J.P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry* 126, 948–955.
- Herrmann, K. (1995). The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* 7, 907–919.
- Huang, L., Guan, T., Qian, Y., Huang, M., Tang, X., Li, Y., and Sun, H. (2011). Anti-inflammatory effects of maslinic acid, a natural triterpene, in cultured cortical astrocytes via suppression of nuclear factor-kappa B. *European Journal of Pharmacology* 672, 169–174.
- INE (2014). *Estatísticas Agrícolas 2013*. Instituto Nacional de Estatística, I.P.
- International Olive Council (2016). *Country Profiles*. [citado Julho de 2017]. Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>
- Issaoui, A., Ksibi, H., and Ksibi, M. (2014). Supercritical fluid extraction of triterpenes and aliphatic hydrocarbons from olive tree derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Jaiswal, R., Jayasinghe, L., and Kuhnert, N. (2012). Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (Ericaceae) by tandem LC-MS: Proanthocyanidins from *Rhododendron*. *Journal of Mass Spectrometry* 47, 502–515.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., and Sayadi, S. (2008). Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions* 176, 88–98.
- Kanakakis, P., Termentzi, A., Michel, T., Gikas, E., Halabalaki, M., and Skaltsounis, A.-L. (2013). From Olive Drupes to Olive Oil. An HPLC-Orbitrap-based Qualitative and Quantitative Exploration of Olive Key Metabolites. *Planta Medica* 79, 1576–1587.
- Kataria, S., Jajoo, A., and Guruprasad, K.N. (2014). Impact of increasing Ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 137, 55–66.
- Kiritsakis, K., Kontominas, M.G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., and Kiritsakis, A. (2010). Composition and Antioxidant Activity of Olive Leaf Extracts from Greek Olive Cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87, 369–376.
- Kolb, C.A., Kopecky, J., Riederer, M., and Pfundel, E.E. (2003). UV screening by phenolics in berries of grapevine (*Vitis vinifera*). *Functional Plant Biology*.
- Kontogianni, V.G., and Gerothanassis, I.P. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. *Natural Product Research* 26, 186–189.
- Kontogianni, V.G., Charisiadis, P., Margianni, E., Lamari, F.N., Gerothanassis, I.P., and Tzakos, A.G. (2013). Olive Leaf Extracts Are a Natural Source of Advanced Glycation End Product Inhibitors. *Journal of Medicinal Food* 16, 817–822.
- Koubouris, G.C., Kavroulakis, N., Metzidakis, I.T., Vasilakakis, M.D., and Sofo, A. (2015). Ultraviolet-B radiation or heat cause changes in photosynthesis, antioxidant enzyme activities and pollen performance in olive tree. *Photosynthetica* 53, 279–287.
- Le Provost, G., Domergue, F., Lalanne, C., Ramos Campos, P., Grosbois, A., Bert, D., Meredieu, C., Danjon, F., Plomion, C., and Gion, J.-M. (2013). Soil water stress affects both cuticular wax content and cuticle-related gene expression in young saplings of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait). *BMC Plant Biology* 13, 95.
- Lee-Huang, S., Zhang, L., Lin Huang, P., Chang, Y.-T., and Huang, P.L. (2003). Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307, 1029–1037.

- Leonardis, A.D., Aretini, A., Alfano, G., Macciola, V., and Ranalli, G. (2008). Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology* 226, 653–659.
- Liakopoulos, G., Stavrianakou, S., and Karabourniotis, G. (2006). Trichome layers versus dehaired lamina of *Olea europaea* leaves: differences in flavonoid distribution, UV-absorbing capacity, and wax yield. *Environmental and Experimental Botany* 55, 294–304.
- Liakoura, V., Stavrianakou, S., Liakopoulos, G., Karabourniotis, G., and Manetas, Y. (1999). Effects of UV-B radiation on *Olea europaea*: comparisons between a greenhouse and a field experiment. *Tree Physiology* 19, 905–908.
- Maehre, H.K., Jensen, I.-J., Elvevoll, E.O., and Eilertsen, K.-E. (2015). ω -3 Fatty Acids and Cardiovascular Diseases: Effects, Mechanisms and Dietary Relevance. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 22636–22661.
- Malheiro, R., Casal, S., Cunha, S.C., Baptista, P., and Pereira, J.A. (2016). Identification of leaf volatiles from olive (*Olea europaea*) and their possible role in the ovipositional preferences of olive fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). *Phytochemistry* 121, 11–19.
- Marangoni, F., and Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research* 61, 193–199.
- Marangoni, C., Cichoski, A.J., Barin, J.S., and Menezes, C.R. (2015). Efeito da incorporação de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) no desenvolvimento e qualidade da carne de frangos. *Brazilian Journal of Food Technology* 18, 173–184.
- Marcos, B., Sárraga, C., Castellari, M., Kappen, F., Schennink, G., and Arnau, J. (2014). Development of biodegradable films with antioxidant properties based on polyesters containing α -tocopherol and olive leaf extract for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life* 1, 140–150.
- Meirinhos, J., Silva, B.M., Valentão, P., Seabra, R.M., Pereira, J.A., Dias, A., Andrade, P.B., and Ferreres, F. (2005). Analysis and quantification of flavonoid compounds from Portuguese olive (*Olea Europaea* L.) leaf cultivars. *Natural Product Research* 19, 189–195.
- Mihailova, A., Abbado, D., and Pedentchouk, N. (2015). Differences in n-alkane profiles between olives and olive leaves as potential indicators for the assessment of olive leaf presence in virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 117, 1480–1485.
- Monteiro-Henriques, T., and Espírito-Santo, M.D. (2011). Climate change and the outdoor regional living plant collections: an example from mainland Portugal. *Biodiversity and Conservation* 20, 335–343.
- Mourato, S., Moreira, M., and Corte-Real, J. (2015). Water Resources Impact Assessment Under Climate Change Scenarios in Mediterranean Watersheds. *Water Resources Management* 29, 2377–2391.
- Myneni, R.B., Keeling, C.D., Tucker, C.J., Asrar, G., and Nemani, R.R. (1997). Increased plant growth in the northern high latitudes from 1981 to 1991. *Nature* 386, 698–702.
- Nejad, M.S., and Niroomand, A. (2007). Study on lipid changes of leaves and fruits olive adapted to high temperature condition Inkhuzestan. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10, 4535–4538.
- Nogués, S., and Baker, N. (2000). Effect of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany* 51, 1309–1317.
- Oddo, E., Saiano, F., Alonzo, G., and Bellini, E. (2002). An Investigation of the Seasonal Pattern of Mannitol Content in Deciduous and Evergreen Species of the Oleaceae Growing in Northern Sicily. *Annals of Botany* 90, 239–243.

- Oliveira, A.M. de, Conserva, L.M., de Souza Ferro, J.N., Brito, F. de A., Lemos, R.P.L., and Barreto, E. (2012). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Octacosanol from the Leaves of *Sabicea grisea* var. *grisea* in Mice. *International Journal of Molecular Sciences* *13*, 1598–1611.
- Olmo-García, L., Bajoub, A., Fernández-Gutiérrez, A., and Carrasco-Pancorbo, A. (2016). Evaluating the potential of LC coupled to three alternative detection systems (ESI-IT, APCI-TOF and DAD) for the targeted determination of triterpenic acids and dialcohols in olive tissues. *Talanta* *150*, 355–366.
- Orozco-Solano, M., Ruiz-Jimenez, J., and Luque De Castro, M.D. (2010a). Characterization of Fatty Alcohol and Sterol Fractions in Olive Tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *58*, 7539–7546.
- Orozco-Solano, M., Ruiz-Jiménez, J., and Luque de Castro, M.D. (2010b). Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* *1217*, 1227–1235.
- Pacetta, C.F. (2013). Estudo de diferentes metodologias para a obtenção de extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea*) contendo oleuropeína. Universidade de São Paulo.
- Pachauri, R.K., Mayer, L., and Intergovernmental Panel on Climate Change (2015). Climate change 2014: synthesis report (Geneva, Switzerland: Intergovernmental Panel on Climate Change).
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., and Pereira, J.A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules* *12*, 1153–1162.
- Pérez-Tortosa, V., López-Orenes, A., Martínez-Pérez, A., Ferrer, M.A., and Calderón, A.A. (2012). Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry* *130*, 362–369.
- Poudyal, H., Campbell, F., and Brown, L. (2010). Olive Leaf Extract Attenuates Cardiac, Hepatic, and Metabolic Changes in High Carbohydrate-, High Fat-Fed Rats. *Journal of Nutrition* *140*, 946–953.
- Quirantes-Piné, R., Lozano-Sánchez, J., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A. (2013a). HPLC-ESI-QTOF-MS as a Powerful Analytical Tool for Characterising Phenolic Compounds in Olive-leaf Extracts: Characterisation of Phenolic Compounds from Olive Leaves. *Phytochemical Analysis* *24*, 213–223.
- Quirantes-Piné, R., Zurek, G., Barrajón-Catalán, E., Bäßmann, C., Micol, V., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A. (2013b). A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC–ESI-QTOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* *72*, 121–126.
- Ramos, A., Trigo, R., and Santo, F. (2011). Evolution of extreme temperatures over Portugal: recent changes and future scenarios. *Climate Research* *48*, 177–192.
- Remorini, D., Melgar, J.C., Guidi, L., Degl’Innocenti, E., Castelli, S., Traversi, M.L., Massai, R., and Tattini, M. (2009). Interaction effects of root-zone salinity and solar irradiance on the physiology and biochemistry of *Olea europaea*. *Environmental and Experimental Botany* *65*, 210–219.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Lage-Yusty, M.A., and López-Hernández, J. (2010). Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chemistry* *121*, 634–638.
- Romero, C., Medina, E., Mateo, M.A., and Brenes, M. (2016). Quantification of bioactive compounds in Picual and Arbequina olive leaves and fruit: Bioactive substances in olive leaves and fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* *97*, 1725–1732.
- Romero-García, J.M., Lama-Muñoz, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Moya, M., Ruiz, E., Fernández-Bolaños, J., and Castro, E. (2016). Obtaining sugars and natural antioxidants from olive leaves by steam-explosion. *Food Chemistry* *210*, 457–465.

- Rossi, L., Sebastiani, L., Tognetti, R., d'Andria, R., Morelli, G., and Cherubini, P. (2013). Tree-ring wood anatomy and stable isotopes show structural and functional adjustments in olive trees under different water availability. *Plant and Soil* 372, 567–579.
- Rufino-Palomares, E.E., Reyes-Zurita, F.J., García-Salguero, L., Mokhtari, K., Medina, P.P., Lupiáñez, J.A., and Peragón, J. (2013). Maslinic acid, a triterpenic anti-tumoural agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells. *Journal of Proteomics* 83, 15–25.
- Sabry, O.M. (2014). Review: Beneficial health effects of olive leaves extracts. *Journal of Natural Sciences Research* 4, 1–9.
- Şahin, S., Bilgin, M., and Dramur, M.U. (2011). Investigation of Oleuropein Content in Olive Leaf Extract Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Soxhlet Methods. *Separation Science and Technology* 46, 1829–1837.
- Salama, H.M.H., Al Watban, A.A., and Al-Fughom, A.T. (2011). Effect of ultraviolet radiation on chlorophyll, carotenoid, protein and proline contents of some annual desert plants. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18, 79–86.
- Sala-Vila, A., Guasch-Ferré, M., Hu, F.B., Sánchez-Tainta, A., Bulló, M., Serra-Mir, M., López-Sabater, C., Sorlí, J.V., Arós, F., Fiol, M., Muñoz, M., Serra-Majem, L., Martínez, J., Corella, D., Fitó, M., Salas-Salvadó, J., Martínez-González, M., Estruch, R., Ros, E. (2016). Dietary α -Linolenic Acid, Marine ω -3 Fatty Acids, and Mortality in a Population With High Fish Consumption: Findings From the PREvención con Dieta MEDiterránea (PREDIMED) Study. *Journal of the American Heart Association* 5.
- Salta, F.N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., and Andrikopoulos, N.K. (2007). Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils Enriched in Polyphenols with Olive Leaf Extract. *Revista de Agaroquímica Y Tecnología de Alimentos* 13, 413–421.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., and Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76, 270–276.
- Sanz, M., Simón, B.F., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A.M., Hernández, T., Estrella, I., and Pinto, E. (2012). LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage: LC-DAD/ESI-MS/MS of ash wood phenolic compounds. *Journal of Mass Spectrometry* 47, 905–918.
- Savoi, S., Wong, D.C.J., Arapitsas, P., Miculan, M., Bucchetti, B., Peterlunger, E., Fait, A., Mattivi, F., and Castellarin, S.D. (2016). Transcriptome and metabolite profiling reveals that prolonged drought modulates the phenylpropanoid and terpenoid pathway in white grapes (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology* 16, 67.
- Shepherd, T., and Wynne Griffiths, D. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist* 171, 469–499.
- Snow, M.D., Bard, R.R., Olszyk, D.M., Minster, L.M., Hager, A.N., and Tingey, D.T. (2003). Monoterpene levels in needles of Douglas fir exposed to elevated CO₂ and temperature. *Physiol Plant* 117, 352–358.
- Sonda, A., Akram, Z., Boutheina, G., Guido, F., and Mohamed, B. (2014). Effect of Addition of Olive Leaves before Fruits Extraction Process to Some Monovarietal Tunisian Extra-Virgin Olive Oils Using Chemometric Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 251–263.
- Spínola, V., Llorent-Martínez, E.J., Gouveia, S., and Castilho, P.C. (2014). *Myrica faya*: A New Source of Antioxidant Phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 9722–9735.
- Taamalli, A., Arráez-Román, D., Barrajón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., Ibañez, E., Micol, V., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., *et al.* (2012). Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 50, 1817–1825.

- Tabera, J., Guinda, Á., Ruiz-Rodríguez, A., Señoráns, F.J., Ibáñez, E., Albi, T., and Reglero, G. (2004). Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of High-Added-Value Compounds from a Hexane Extract of Olive Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4774–4779.
- Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A.M., León, L., De la Rosa, R., Fernández-Gutiérrez, A., and Segura-Carretero, A. (2015). Pattern of Variation of Fruit Traits and Phenol Content in Olive Fruits from Six Different Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 10466–10476.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D., and Agati, G. (2004). Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163, 547–561.
- Toumi, I., Gargouri, M., Nouairi, I., Moschou, P.N., Salem-Fnayou, A.B., Mliki, A., Zarrouk, M., and Ghorbel, A. (2008). Water stress induced changes in the leaf lipid composition of four grapevine genotypes with different drought tolerance. *Biologia Plantarum* 52, 161–164.
- Traber, M.G., and Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine* 43, 4–15.
- UNEP Environmental Effects Panel (2010). Environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: 2010 assessment (Nairobi, Kenya: Ozone Secretariat, United Nations Environment Programme (UNEP)).
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., and Foolad, M.R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61, 199–223.
- Wang, Y., and Huang, F. (2015). N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammation in Obesity: Local Effect and Systemic Benefit. *BioMed Research International* 2015.
- Wang, T., Liu, Y., Wang, X., Yang, N., Zhu, H., and Zuo, P. (2010). Protective effects of octacosanol on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats via regulation of ProNGF and NGF signaling. *Acta Pharmacologica Sinica* 31, 765–774.
- WHO (2015). Healthy diet. [citado Setembro de 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs394/en/>
- Young, D.L.W., Wiegand, M.D., Loadman, N.L., Collins, S.A., Ballevena, A.J., and Huebner, J.D. (2006). Effects of artificial ultraviolet-B radiation on growth and fatty acid composition of duckweed (*Lemna minor*). *Freshwater Biology* 51, 2029–2040.
- Yu, Y.-M., Chao, T.-Y., Chang, W.-C., Chang, M.J., and Lee, M.-F. (2016). Thymol reduces oxidative stress, aortic intimal thickening, and inflammation-related gene expression in hyperlipidemic rabbits. *Journal of Food and Drug Analysis* 24, 556–563.
- Zhao, N., Wang, L., and Guo, N. (2016). α -Linolenic acid increases the G0/G1 switch gene 2 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from obese patients: a pilot study. *Lipids in Health and Disease* 15, 36.
- Zhong, D., Du, H., Wang, Z., and Huang, B. (2011). Genotypic Variation in Fatty Acid Composition and Unsaturation Levels in Bermudagrass Associated with Leaf Dehydration Tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 136, 35–40.

ANEXOS

Anexo 1. Padrões utilizados na quantificação de compostos lipofílicos

Tabela 7. Registo de A/A_{pi} média para cada concentração de octadecano (mg/mL).

[Octadecano] (mg/mL)	A/A_{pi}
0,765	7,797
0,612	5,523
0,459	3,703
0,306	1,978
0,238	0,200

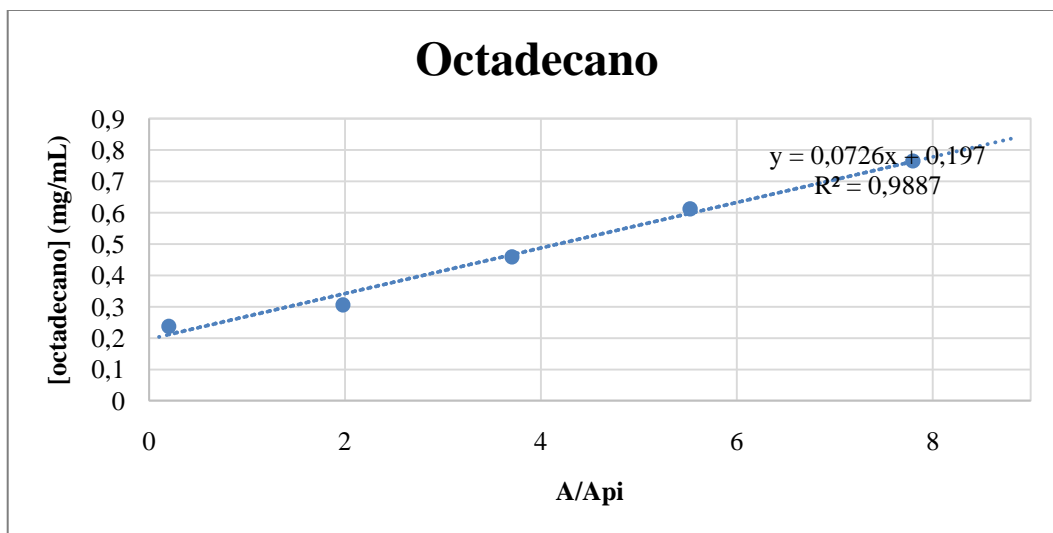


Figura 41. Reta de calibração de octadecano (padrão utilizado para a quantificação de alcanos)

Tabela 8. Registo de A/A_{pi} média para cada concentração de ácido palmítico (mg/mL).

[Ácido Palmítico] (mg/mL)	A/A_{pi}
8,500	86,843
4,300	36,251
2,800	21,798
1,400	10,036
0,500	2,600
0,008	0,970
0,005	0,639

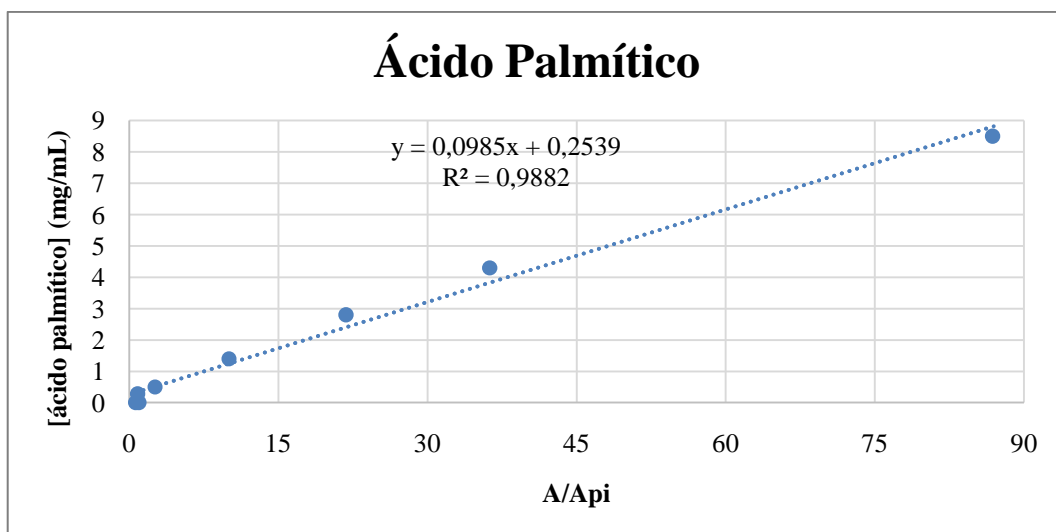


Figura 42. Reta de calibração de ácido palmítico (padrão utilizado para a quantificação de ácidos gordos)

Tabela 9. Registo de A/A_{pi} média para cada concentração de maltose (mg/mL).

[Maltose] (mg/mL)	A/A_{pi}
0,327	7,886
0,221	4,709
0,169	3,351
0,085	1,348
0,024	0,515
0,009	0,062

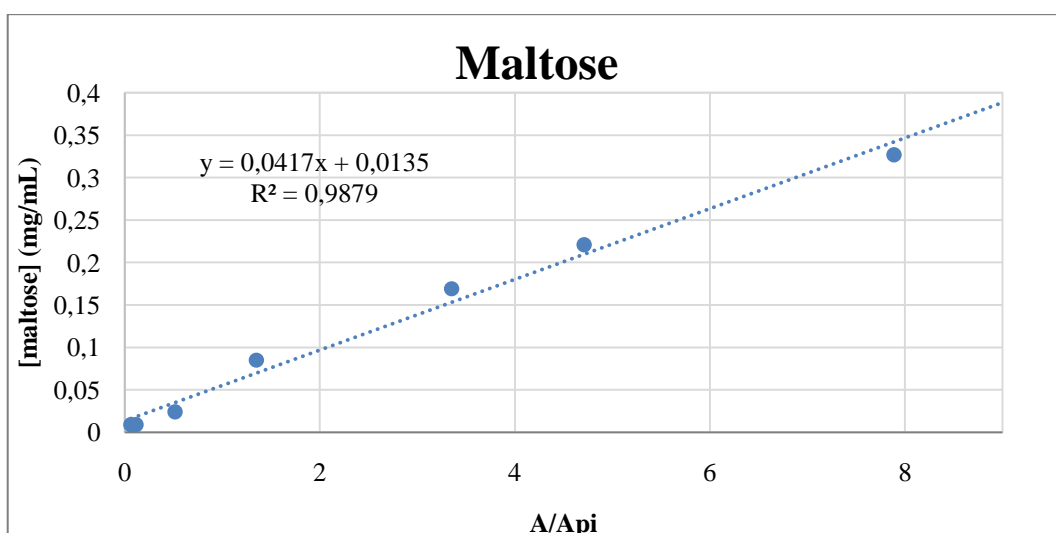


Figura 43. Reta de calibração de colesterol (padrão utilizado para a quantificação de esteróis e terpenos)

Tabela 10. Registro de A/A_{pi} média para cada concentração de colesterol (mg/mL).

[Colesterol] (mg/mL)	A/A_{pi}
0,726	10,917
0,429	7,215
0,165	1,200
0,100	0,773
0,080	0,569
0,060	0,340
0,040	0,230

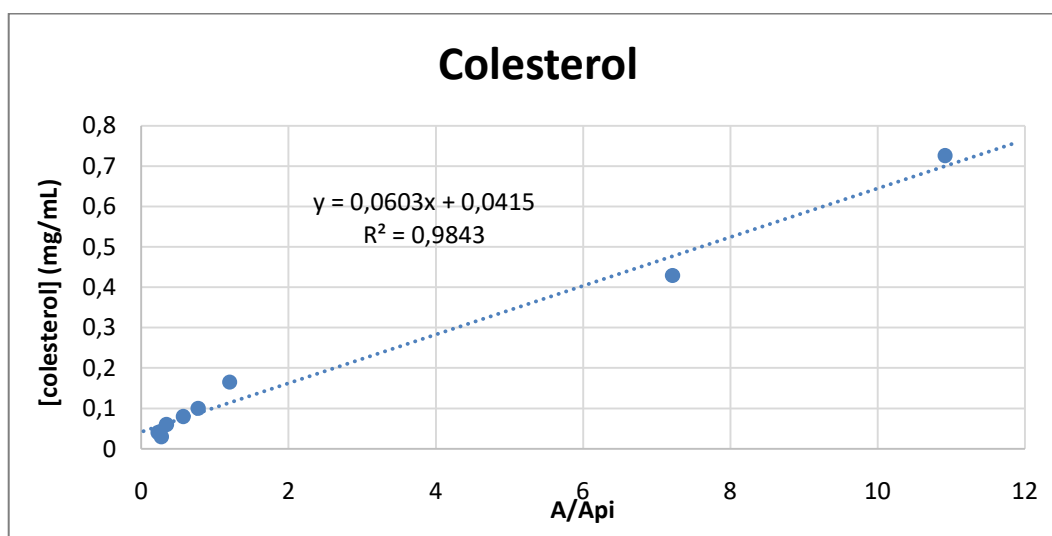


Figura 44. Reta de calibração de colesterol (padrão utilizado para a quantificação de esteróis e terpenos)

Anexo 2. Padrões utilizados na quantificação dos compostos fenólicos

Tabela 11. Registo da área média para cada concentração de ácido cafeico (mg/mL).

[Ácido Cafeico] (mg/mL)	Área
0,126	3158326
0,010	283438
0,001	22263

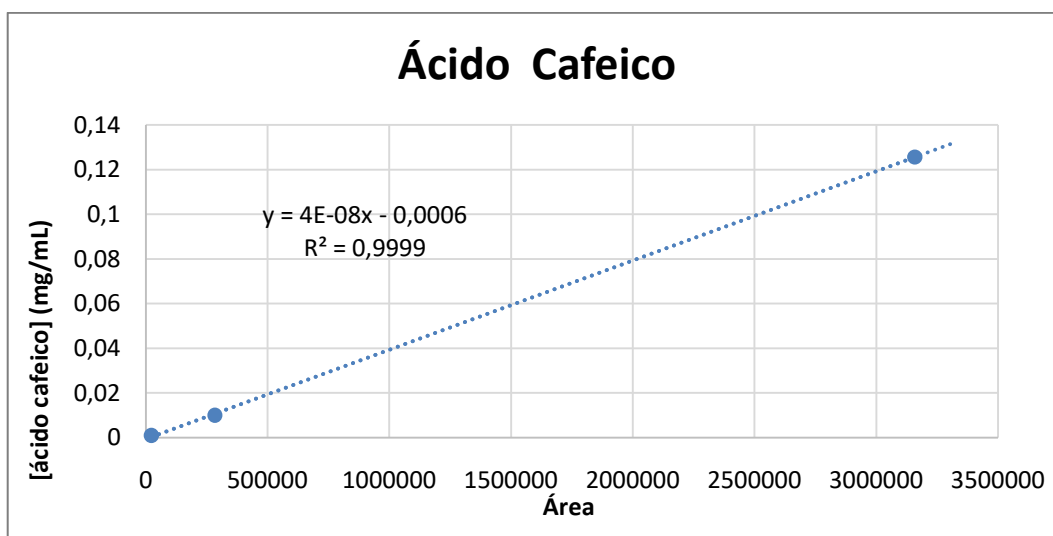


Figura 45. Reta de calibração de ácido cafeico (padrão utilizado para a quantificação de derivados do ácido hidroxicinâmico e de secoiridoides).

Tabela 12. Registo da área média para cada concentração de ácido ursólico (mg/mL).

[Ácido ursólico] (mg/mL)	Área
0,510	4257257
0,005	43117
$5,100 \times 10^5$	9970

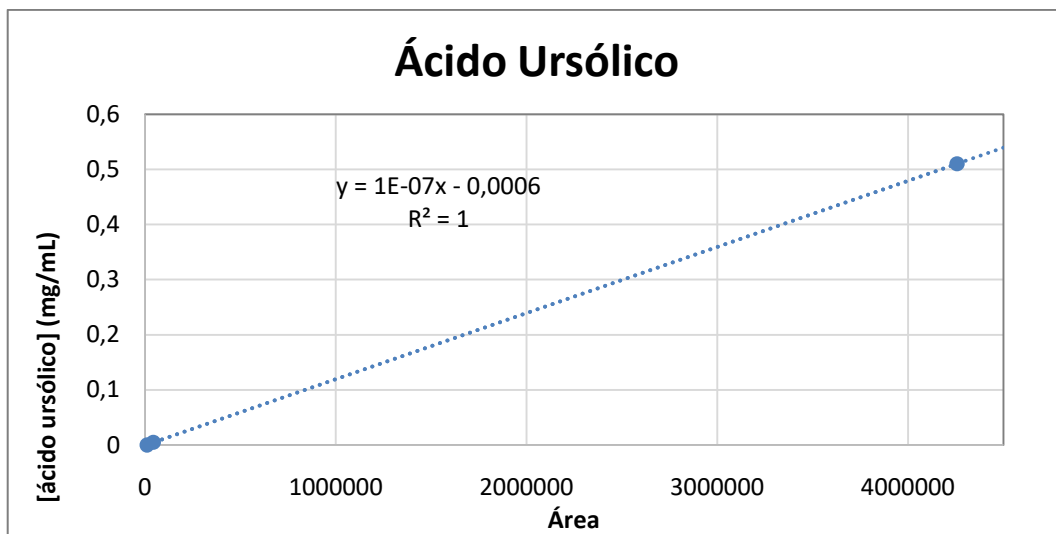


Figura 46. Reta de calibração de ácido ursólico (padrão utilizado para a quantificação de ácidos carboxílicos).

Tabela 13. Registro da área média para cada concentração de quercetina (mg/mL).

[Quercetina] (mg/mL)	Área
0,528	6146177
0,106	1275753
0,042	537813
0,011	118396
0,001	9121

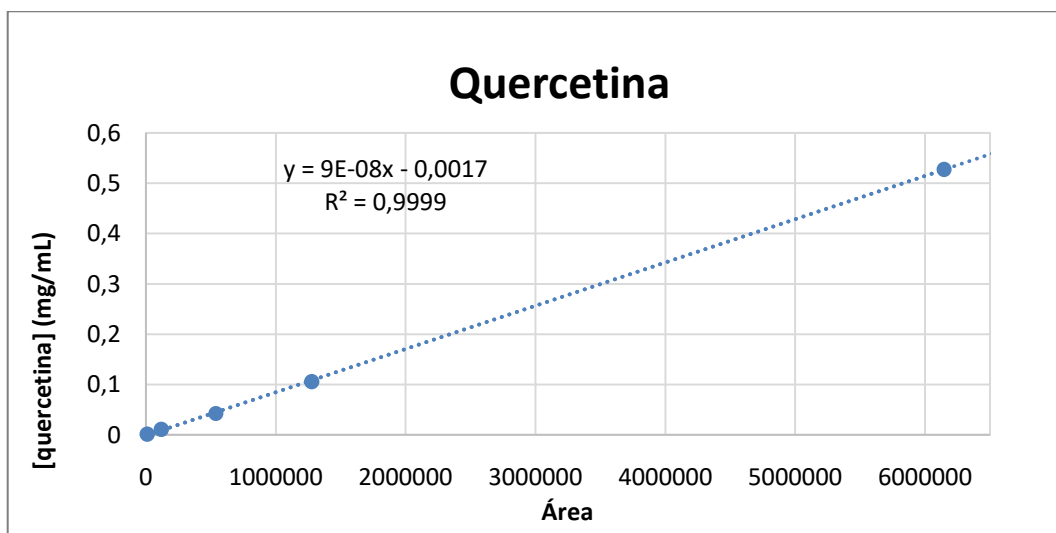


Figura 47. Reta de calibração de quercetina (padrão utilizado para a quantificação de flavonoides).

Anexo 3. Padrão de quercetina usado na determinação da AA

Tabela 14. Registro da absorvência média para cada concentração de quercetina.

Quercetina (mg/mL)	Abs Média
0	0,685
0,086	0,570
0,129	0,504
0,344	0,303

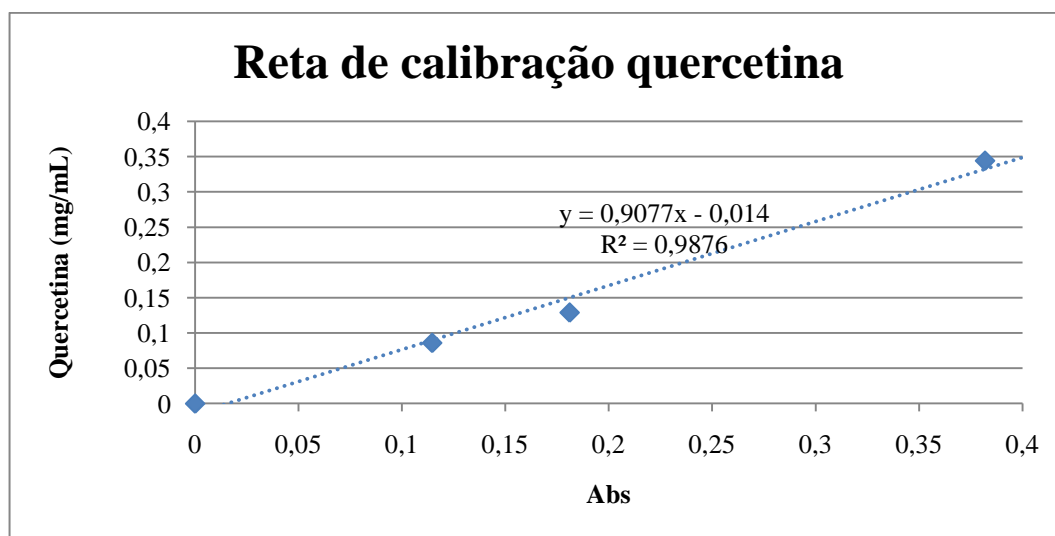


Figura 48. Reta de calibração de quercetina (padrão utilizado para a determinação da AA).